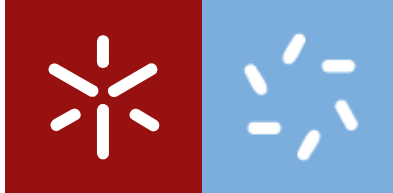


**Universidade do Minho**  
Escola de Ciências

Joana Catarina Dias Moreira

**Uma nova abordagem antimicrobiana à  
base de materiais eletroativos**





**Universidade do Minho**

Escola de Ciências

Joana Catarina Dias Moreira

**Uma nova abordagem antimicrobiana à  
base de materiais eletroativos**

Dissertação de Mestrado

Mestrado Biofísica e Bionanossistemas

Trabalho efetuado sob orientação da

**Doutora Margarida M. Fernandes**

e da

**Doutora Clárisse Ribeiro**

## DIREITOS DE AUTOR E CONDIÇÕES DE UTILIZAÇÃO DO TRABALHO POR TERCEIROS

Este é um trabalho académico que pode ser utilizado por terceiros desde que respeitadas as regras e boas práticas internacionalmente aceites, no que concerne aos direitos de autor e direitos conexos.

Assim, o presente trabalho pode ser utilizado nos termos previstos na licença abaixo indicada.

Caso o utilizador necessite de permissão para poder fazer um uso do trabalho em condições não previstas no licenciamento indicado, deverá contactar o autor, através do RepositóriUM da Universidade do Minho.

Licença concedida aos utilizadores deste trabalho



Atribuição CC BY

<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>

## AGRADECIMENTOS

Gostaria de expressar a minha gratidão a todos que de forma direta ou indireta contribuíram para a realização deste trabalho.

Aos meus orientadores Doutora Margarida M. Fernandes e Doutora Clarisse Ribeiro. A elas agradeço toda a disponibilidade.

À Doutora Margarida M. Fernandes. Um especial obrigada pelo apoio, acompanhamento, dedicação, incentivo e orientação científica que me transmitiu ao longo de todo o trabalho.

Ao Professor Doutor Senentxu Lanceros-Mendez agradeço a disponibilidade e a oportunidade que me deu em ter ingressado no seu grupo de trabalho.

Quero agradecer também a todo o grupo *Eletroactive Smart Materials*, pelo bom ambiente e pela ajuda que sempre me prestaram. Em especial à Daniela e à Estela deixo o meu muito obrigada pela preocupação.

A todos os meus amigos, em especial aos que me acompanham sempre. Obrigada por estarem sempre comigo, por me ajudarem e me apoiarem nos momentos mais difíceis. Obrigada pela amizade e carinho.

Por fim, gostaria de agradecer à minha família, sobretudo aos meus pais por sempre me incentivarem e ajudarem em todas as etapas da minha vida. A eles devo tudo o que sou hoje.

A todos vocês o meu sincero obrigada.

## DECLARAÇÃO DE INTEGRIDADE

Declaro ter atuado com integridade na elaboração do presente trabalho académico e confirmo que não recorri à prática de plágio nem a qualquer forma de utilização indevida ou falsificação de informações ou resultados em nenhuma das etapas conducente à sua elaboração.

Mais declaro que conheço e que respeitei o Código de Conduta Ética da Universidade do Minho.

## RESUMO

As bactérias são organismos extraordinários que possuem a capacidade de adaptação a diferentes ambientes, tolerando uma grande variedade de temperaturas, pressões, pHs e capacidade de adquirir resistência como mecanismo de sobrevivência. Tendo em consideração estes mecanismos de adaptação, este trabalho tem como base investigar a capacidade que as bactérias apresentam em sentir o efeito de microambientes eletricamente ativos (efeito mecanoelétrico em materiais piezoelétricos) em sinergia com as nanopartículas de prata (AgNPs), também elas sintetizadas neste trabalho utilizando um processo sustentável de forma a induzir um efeito antimicrobiano melhorado.

Os microambientes elétricos produzidos neste trabalho foram gerados através da estimulação de um nanocompósito composto por um polímero piezoelétrico e por AgNPs recorrendo a um biorreator mecânico, capaz de induzir uma resposta elétrica no material, que é traduzida posteriormente para as células bacterianas. A bactéria Gram-positiva *Staphylococcus epidermidis* (*S. epidermidis*) e Gram-negativa *Escherichia coli* (*E. coli*) foram cultivadas *overnight* sob condições estáticas (para estudar o efeito da morfologia) e dinâmicas (para estudar o efeito mecanoelétrico) sobre filmes de copolímero piezoelétrico poli (fluoreto de vinilideno-co-trifluoretileno) (P(VDF-TrFE)) na presença e ausência de AgNPs, para também estudar o seu efeito biocida. As AgNPs e os compósitos desenvolvidos foram caracterizados e a viabilidade bacteriana nas formas planctônica e de biofilme foram analisadas. Os ensaios antimicrobianos foram executados utilizando o copolímero P(VDF-TrFE) uma vez que os estudos de caracterização realizados inicialmente com nanocompósitos de poli (fluoreto de vinilideno) (PVDF) demonstraram que as AgNPs não induziram a nucleação da fase  $\beta$  no PVDF, e por isso não induziram um efeito mecanoelétrico nos materiais compósitos e, por conseguinte, não permitiria o estudo da sinergia entre os ambientes elétricos e o agente antimicrobiano usado.

As AgNPs sintetizadas usando o dextrano como agente redutor, foram caracterizadas em termos de: i) tamanho, demonstrando ter cerca de 270 nm de diâmetro, ii) potencial zeta, apresentando carga negativa, iii) capacidade antimicrobiana, inibindo o crescimento bacteriano a concentrações acima dos 7-10 % e iv) biocompatibilidade sendo que foram consideradas biocompatíveis a concentrações abaixo dos 10-12 %.

Os nanocompósitos de P(VDF-TrFe) incorporando AgNPs foram também caracterizados em termos de i) morfologia, sendo que os porosos apresentaram poros à sua superfície e no seu interior enquanto que os não porosos apresentam uma morfologia lisa, estando as AgNPs bem dispersas no polímero, ii) propriedades físico químicas, provando que o polímero cristalizou, tal como esperado, na fase  $\beta$  eletroativa e que a presença das partículas não afetou este fator, iii) propriedades térmicas, indicando que a presença das partículas aumentou ligeiramente a cristalinidade do polímero e que os materiais são estáveis termicamente e iv) capacidade antimicrobiana contra as bactérias *E. coli* e *S. epidermidis* a nível das células planctônicas e aderidas no material.

Enquanto que a *E. coli* mostrou ser pouco suscetível à aplicação de estímulos, *S. epidermidis* mostrou ser mais sensível. A presença de AgNPs nos filmes induziu a inibição do crescimento bacteriano em células planctônicas e aderidas, tanto em condições estáticas como em condições dinâmicas, sendo o efeito mais pronunciado quando o estímulo mecanoelétrico é aplicado. As propriedades biocidas e “*antifouling*” foram observadas na presença de estímulo piezoelétrico dinâmico, indicando um efeito sinérgico eficiente entre as propriedades biocidas das nanopartículas de prata e os microambientes eletroativos, que representa um avanço para superar a resistência antimicrobiana.



## ABSTRACT

Bacteria are extraordinary organisms, with capacity to feel and adapt to different environments, tolerating a big range of temperatures, pressures and pHs and having the ability to acquire resistance as a mechanism of survival. Talking into consideration these adapting mechanisms, this work now investigates the capacity of bacteria to feel the effect of electrically active microenvironments in synergy with green-synthesized silver nanoparticles (AgNPs) to induce an antimicrobial effect.

Electrical microenvironments were generated via stimulation of a nanocomposite comprised of a piezoelectric polymer and AgNPs with a mechanical cue using a lab-made mechanical bioreactor, thus developing an electrical response on the material, further translated to bacterial cells. Specifically, Gram-positive *Staphylococcus epidermidis* (*S. epidermidis*) and Gram-negative *Escherichia coli* (*E. coli*) were grown overnight under static (to study the effect of morphology) and dynamic (to study the mechanoelectric effect) conditions on piezoelectric copolymer poly(vinylidene fluoride-co-trifluoroethylene) (P(VDF-TrFE)) films in presence and absence of silver nanoparticles (to study the biocidal effect). The composites were thoroughly characterized and bacteria viability in planktonic and biofilm forms was measured. The antimicrobial assay was performed using the copolymer P(VDF-TrFE) because the characterization studies showed that AgNPs did not induce a nucleation effect on the  $\beta$  phase of poly(vinylidene fluoride) (PVDF).

The AgNPs synthesized using dextran as a reducing agent, were characterized in terms of: i) size, demonstrating to have about 270 nm in diameter, ii) zeta potential, presenting negative charge, iii) antimicrobial capacity, inhibiting bacterial growth at concentrations above 7-10 % (v/V) and iv) biocompatibility, being considered biocompatible at concentrations below 10-12 (v/V)%.

The nanocomposites of poly(vinylidene fluoride-co-trifluoroethylene) (P(VDF-TrFE)) incorporating AgNPs were also characterized in terms of i) morphology, with pores having pores on their surface and inside while non-porous ones have a smooth morphology, with AgNPs well dispersed in polymer, ii) physical and chemical properties, proving the polymer crystallized, as expected, in the electroactive  $\beta$  phase and that the presence of the particles did not affect this factor, iii) thermal properties, indicating that the presence of the particles slightly increased the

crystallinity of the polymer and that the materials are thermally stable and iv) antimicrobial capacity with *E.coli* and *S. epidermidis* bacteria at the level of planktonic and adherent cells in the material.

Whereas *E. coli* responds little to the stimuli applications, *S. epidermidis* was found to be more susceptible. The presence of the silver nanoparticles in the films induced bacterial growth inhibition in planktonic and adhered cells either static and dynamic conditions, being the effect more pronounced when the mechanoelectric effect is applied. Both biocidal and antifouling properties have been observed upon dynamic piezoelectric stimulation of the films indicating an efficient synergistic effect between the biocidal properties of silver nanoparticles and the electroactive microenvironments, which could be an important breakthrough to overcome the antimicrobial resistance.

# ÍNDICE

AGRADECIMENTOS.....	III
RESUMO.....	IV
ABSTRACT .....	VII
LISTA DE FIGURAS.....	XII
LISTA DE TABELAS .....	XV
LISTA DE SÍMBOLOS E ACRÓNIMOS .....	XVI
1. INTRODUÇÃO.....	18
1.1 Enquadramento .....	19
1.2 Motivação, objetivos e metodologia.....	20
1.3 Organização da Dissertação .....	22
2. ESTADO DA ARTE.....	23
2.1 Relevância dos microambientes de células bacterianas.....	24
2.2 Resistência antimicrobiana.....	25
2.2.1 Equilíbrio antimicrobiano e pró-microbiano .....	26
2.2.1.1 Estudos dos estímulos mecânicos .....	28
2.2.1.2 Estudo dos estímulos elétricos .....	29
2.2.1.3 Estudo dos estímulos magnéticos .....	30
2.2.1.4 Estudo dos estímulos bioquímicos.....	30
2.2.2 Interação bacteriana com a superfície .....	32
2.2.3 Formação de biofilme.....	35
2.3 Compostos antimicrobianos: prata e mecanismos de ação .....	36
2.4 Materiais inteligentes e superfícies ativas para adaptar respostas bacterianas .....	38
2.4.1 Poli (fluoreto de vinilideno) .....	41

2.4.2 Poli (fluoreto de vinilideno-co-trifluoretileno) .....	44
<b>3. MATERIAIS E MÉTODOS .....</b>	<b>45</b>
3.1 Materiais.....	46
3.2 Síntese de nanopartículas .....	46
3.3 Caracterização das nanopartículas de prata.....	47
3.3.1 Espalhamento dinâmico da luz.....	47
3.3.2 Potencial Zeta .....	48
3.3.3 Microscopia eletrônica de varrimento .....	49
3.3.4 Atividade bacteriostática das nanopartículas de prata.....	50
3.3.3 Citotoxicidade das nanopartículas de prata .....	50
3.4 Desenvolvimento de compósitos: Processamento de filmes de PVDF e PVDF/AgNPs..	51
3.5 Caracterização dos compósitos de PVDF e PVDF/AgNPs .....	52
3.5.1 Espectroscopia de infravermelho com transformadas de Fourier .....	52
3.6 Desenvolvimento de compósitos: Processamento de filmes de P(VDF-TrFe) e P(VDF-TrFe) /AgNPs.....	54
3.7 Caracterização dos compósitos de P(VDF-TrFE) e P(VDF-TrFE) /AgNPs.....	55
3.7.1 Microscopia eletrônica de varrimento .....	55
3.7.2 Propriedades térmicas .....	55
3.7.2.1. Calorimetria diferencial de varrimento .....	55
3.7.2.2. Análise termogravimétrica .....	57
3.7.3 Espectroscopia de infravermelho com transformadas de Fourier .....	58
3.8. Ensaios antimicrobianos: Compósitos de P(VDF-TrFe) e P(VDF-TrFE) / AgNPs em condições estáticas e dinâmicas .....	59
3.8.1 Avaliação da viabilidade das células planctônicas em solução: CFU .....	60
3.8.2 Avaliação de bactérias aderidas: Ensaios de <i>LIVE/DEAD</i> .....	61

<b>4. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>64</b>
4.1 Caraterização das nanopartículas de prata .....	65
4.2 Análise dos compósitos desenvolvidos de PVDF e PVDF /AgNPs por Espetroscopia de Infravermelho com Transformadas de Fourier .....	68
4.3 Análise dos compósitos desenvolvidos de P(VDF-TrFe) e P(VDF-TrFe) /AgNPs .....	70
4.3.1 Microscopia eletrónica de varrimento .....	70
4.3.2 Espetroscopia de Infravermelho com Transformadas de Fourier.....	72
4.3.3 Propriedades térmicas: Avaliação Termogravimétrica e Calorimetria Diferencial de Varrimento .....	73
4.4 Ensaio antimicrobianos .....	74
4.4.1 Estudo da capacidade antimicrobiana nas células planctónicas: atividade bacteriostática.....	75
4.4.2 Estudo da capacidade antimicrobiana nas células planctónicas: atividade bactericida. ....	77
4.4.3 Estudo da capacidade antifouling/antibiofilme .....	78
<b>5. CONCLUSÃO.....</b>	<b>82</b>
5.1 Sugestões para trabalhos futuros.....	84
<b>6. BIBLIOGRAFIA.....</b>	<b>85</b>

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 2.1.</b> Representação esquemática de <b>(A)</b> linha do tempo para o desenvolvimento da resistência bacteriana e <b>(B)</b> impacto dessa resistência na flora natural presente no intestino humano. Antes da descoberta da penicilina em 1940, as infecções causadas por bactérias matavam milhões de pessoas, mas o microbioma do nosso intestino apresentava inúmeros micróbios inofensivos. Após 1940, o aparecimento de antibióticos permitiu curar doenças anteriormente mortais e salvou uma grande quantidade de vidas. No entanto, a aplicação constante de antibióticos resultou no aparecimento de estirpes resistentes a antibióticos. Os micróbios inofensivos da flora intestinal também foram mortos, dando lugar à proliferação de estirpes resistentes. Adaptado de (1).....	26
<b>Figura 2.2.</b> Estímulos detectados pelas bactérias e respetivo mecanismo de ação para cada efeito bactericida. Estimulo: <b>(A)</b> mecânico; <b>(B)</b> elétrico; <b>(C)</b> magnético e <b>(D)</b> bioquímico. ....	32
<b>Figura 2.3.</b> Diferenças estruturais na parede celular de bactérias Gram-negativas e Gram-positivas. ....	33
<b>Figura 2.4.</b> Ilustração esquemática da adesão bacteriana e dos efeitos das propriedades do material em ambientes complexos. Os efeitos representados são: efeito de carga de superfície, hidrofobicidade, rugosidade, topografia e rigidez. Adaptado de (37).....	35
<b>Figura 2.5.</b> Ciclo de vida do biofilme. <b>(A)</b> Fixação/adesão das bactérias à superfície; <b>(B)</b> Formação de monocamadas e produção de substância polimérica extracelular; <b>(C)</b> Formação e proliferação de microcolónias; <b>(D)</b> Dispersão do biofilme; <b>(E)</b> Início de um novo ciclo de vida. Adaptado de (39).....	36
<b>Figura 2.6.</b> Estrutura química do PVDF .....	42
<b>Figura 2.7.</b> Representação esquemática da estrutura esferulítica do PVDF. Adaptado de (69). .	42
<b>Figura 2.8.</b> Representação das cadeias $\alpha$ - e $\beta$ -PVDF. Adaptado de (72). ....	43
<b>Figura 2.9.</b> Representação do copolímero P(VDF-TrFE). Adaptado de (74).....	44
<b>Figura 3.1.</b> Representação esquemática do mecanismo de síntese das AgNPs e da ligação de coordenação formada entre moléculas de dextrano e AgNPs. ....	47

<b>Figura 3.2.</b> Diagrama da concentração iônica e da diferença de potencial em função da distância da superfície carregada de uma partícula suspensa em meio disperso. Adaptado de (56). .....	48
<b>Figura 3.3.</b> Método de processamento de filmes porosos e não porosos por <i>Doctor Blade</i> . .....	55
<b>Figura 3.4.</b> Equipamento utilizado nos ensaios de calorimetria diferencial de varrimento: <i>Perkin Elmer DSC-6000</i> . .....	57
<b>Figura 3.5.</b> Equipamento utilizado nos ensaios de análise termogravimétrica: <i>Perkin Elmer TGA-4000</i> . .....	58
<b>Figura 3.6.</b> Representação esquemática dos procedimentos efetuados para os ensaios antimicrobianos de <i>E. coli</i> e <i>S. epidermidis</i> em condições estáticas e dinâmicas: esterilização e incubação do material. ....	60
<b>Figura 3.7.</b> Biorreator mecânico fabricado em laboratório utilizado nos ensaios antimicrobianos em condições dinâmicas. ....	60
<b>Figura 3.8.</b> Representação esquemática dos procedimentos efetuados para os ensaios de viabilidade planctônica. ....	61
<b>Figura 3.9.</b> Representação esquemática do microscópio de fluorescência. ....	62
<b>Figura 4.1.</b> Nanopartículas de prata produzidas com diferentes concentrações de $\text{AgNO}_3$ e de dextrano: 0.2Ag0.03Dex, 0.4Ag0.06Dex e 0.8Ag0.12Dex. ....	65
<b>Figura 4.2.</b> Caracterização das nanopartículas de prata constituídas por diferentes concentrações de Ag e Dextrano (0.2Ag0.03Dex, 0.4Ag0.06Dex e 0.8Ag0.12Dex). <b>(A)</b> Análise espectrofotométrica de absorção UV-vis das AgNPs; <b>(B)</b> Micrografia SEM representativa das AgNPs esféricas; <b>(C)</b> Análise do tamanho e do índice de polidispersividade (PDI) das AgNPs; <b>(D)</b> Análise do potencial zeta das AgNPs. ....	66
<b>Figura 4.3.</b> Ensaios antimicrobianos para avaliar a atividade bacteriostática de bactéria: <b>(A)</b> <i>E. coli</i> , <b>(B)</b> <i>S. epidermidis</i> e <b>(C)</b> ensaio de biocompatibilidade das AgNPs (0.4Ag0.06Dex) em células de pré-osteoblastos de mamíferos. ....	68

<b>Figura 4.4.</b> Espectroscopia de Infravermelho com Transformadas de Fourier. <b>(A)</b> Espectro FTIR-ATR dos nanocompósitos não porosos de PVDF e PVDF contendo nanopartículas de prata e <b>(B)</b> Percentagem de $F(\beta)$ calculada para cada nanocompósito. ....	69
<b>Figura 4.5.</b> Imagens de microscopia eletrônica de varrimento (SEM) representativa da secção transversal e da imagem de superfície dos filmes porosos (25 °C) e não porosos (210 °C) de P(VDF-TrFe) e P(VDF-TrFe) na presença (Ag) e ausência ( $\emptyset$ Ag) de nanopartículas de prata. A imagem de superfície na presença de AgNPs é acompanhada da imagem de espectroscopia de raio-X de energia dispersa (EDS) que prova a presença de prata. ..	71
<b>Figura 4.6.</b> Espectro de FTIR-ATR dos compósitos porosos e não porosos de P(VDF-TrFe) e P(VDF-TrFe)/AgNPs. ....	72
<b>Figura 4.7.</b> Análise térmica dos compósitos porosos e não porosos de P(VDF-TrFe) e P(VDF-TrFe)/AgNPs. <b>(A)</b> Curva DSC, <b>(B)</b> Grau de cristalinidade (%) calculado para cada nanocompósito, <b>(C)</b> Curva TGA e <b>(D)</b> Curva da derivada TGA. ....	74
<b>Figura 4.8.</b> Atividade celular bacteriostática de <b>(A)</b> <i>E. coli</i> e <b>(B)</b> <i>S. epidermidis</i> em solução após incubação durante a noite sobre o material em condições estáticas e dinâmicas através da aplicação do estímulo mecânico no material piezoelétrico usando uma frequência de vibração mecânica de 4 Hz. A percentagem de viabilidade celular bacteriana calculada está relacionada com células controle que cresceram nas mesmas condições, mas sem o material ou estímulo. Os resultados são a média de três ensaios independentes. ....	76
<b>Figura 4.9.</b> Viabilidade celular bacteriana de células planctônicas de <b>(A)</b> <i>E.coli</i> e <b>(B)</b> <i>S. epidermidis</i> em solução após incubação durante a noite sobre o material em condições estáticas e dinâmicas através da aplicação do estímulo mecânico no material piezoelétrico usando uma frequência de vibração mecânica de 4 Hz. A viabilidade celular bacteriana foi determinada em relação às células controle que cresceram nas mesmas condições, mas sem o material ou estímulo. ....	77
<b>Figura 4.10.</b> Imagens <i>Live/Dead</i> de <i>E. coli</i> por microscopia de fluorescência em diferentes superfícies do material após 12h de incubação. A barra de escala representa 100 $\mu$ m para todas as imagens. ....	79



<b>Figura 4.11.</b> Imagens <i>Live/Dead</i> de <i>S. epidermidis</i> por microscopia de fluorescência em diferentes superfícies do material após 12h de incubação. A barra de escala representa 20 $\mu\text{m}$ para todas as imagens.....	80
--	----

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 2.1.</b> Vantagens e desvantagens dos diferentes tipos de biomateriais (55). ....	39
<b>Tabela 3.1.</b> Concentrações de $\text{AgNO}_3$ e dextrano utilizadas na síntese de AgNPs e respetiva nomenclatura atribuída às AgNPs.....	46
<b>Tabela 3.2.</b> Bandas de absorção características das fases $\alpha$ e $\beta$ do PVDF. Adaptado de (68). ...	54
<b>Tabela 4.1.</b> Resumo das principais conclusões obtidas neste trabalho.....	81

## LISTA DE SÍMBOLOS E ACRÓNIMOS

**Ag<sup>+</sup>**- Ião prata

**AgNPs**- Nanopartículas de prata (do inglês *Silver Nanoparticles*)

**ATR**- Reflexão total atenuada (do inglês *Attenuated Total Reflection*)

**BSE**- Eletrões retrodispersos (do inglês *Backscattered Electrons*)

**CFUs**- Unidades formadoras de colónias (do inglês *Colony-Forming Units*)

**DCS**- Colorimetria diferencial de varrimento (do inglês *Differential Scanning Calorimetry*)

**DLS**- Espalhamento dinâmico de luz (do inglês *Dynamic Light Scattering*)

**DMF**- Dimetilformamida

**DO**- Densidade ótica

**EBSD**- Eletrões retrodispersos difratados (do inglês *Electron Backscatter Diffraction*)

**EDS**- Espectroscopia dispersiva de energia (do inglês *Energy Dispersive X-ray Spectroscopy*)

**FRET**- Transferência ressonante de energia por fluorescência (do inglês *Fluorescence Resonance Energy Transfer*)

**FTIR**- Espectroscopia de infravermelho com transformadas de Fourier (do inglês *Fourier Transform Infrared Spectroscopy*)

**H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>**- Peróxido de hidrogénio

**IV**- Infravermelho

**K<sup>+</sup>**- Ião potássio

**MICs**- Concentração mínima inibitória (do inglês *Minimum Inhibitory Concentration*)

**MRSA**- *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina (do inglês *Methicilin Resistant Staphylococcus aureus*)

**Na<sup>+</sup>**- Ião sódio

**NB-** Caldo nutritivo (do inglês *Nutrient Broth*)

**OMS-** Organização Mundial de Saúde

**PBS-** Tampão fosfato (do inglês *Phosphate-Buffered Saline*)

**PCS-** Espectroscopia de correlação de fótons (do inglês *Photoncorrelation Spectroscopy*)

**PDI-** Índice de polidispersão (do inglês *Polydispersity Index*)

**PLA-** Poli (ácido láctico)

**PLLA-** Poli (L-ácido láctico)

**PVDF-** Poli (fluoreto de vinilideno)

**PVDF /AgNPs-** Poli (fluoreto de vinilideno-co-trifluoretileno) contendo nanopartículas de prata

**P(VDF-TrFE) -** Poli (fluoreto de vinilideno-co-trifluoretileno)

**P(VDF-TrFE) /AgNPs-** Poli (fluoreto de vinilideno-co-trifluoretileno) contendo nanopartículas de prata

**RNS-** Espécies reativas de nitrogénio (do inglês *Reactive Nitrogen Species*)

**ROS-** Espécies reativas de oxigénio (do inglês *Reactive Oxidative Species*)

**SE-** Eletrões secundários (do inglês *Secondary Electrons*)

**SEM-** Microscopia eletrónica de varrimento (do inglês *Scanning Electron Microscopy*)

**T<sub>c</sub>-** Temperatura de cristalização

**T<sub>g</sub>-** Transição vítrea

**TGA-** Análise termogravimétrica (do inglês *Thermogravimetry Analysis*)

**T<sub>m</sub>-** Temperatura de fusão

**ΔH<sub>c</sub>-** Grau de cristalinidade

**ΔH<sub>f</sub>-** Entalpia de fusão

## 1.INTRODUÇÃO

---

## 1.1 Enquadramento

A resistência antimicrobiana é um dos principais desafios de saúde pública no mundo dado que o uso persistente, excessivo e indevido de antibióticos em todo o mundo levou a um aumento alarmante na incidência de bactérias resistentes. Atualmente, as bactérias resistentes infetam milhões de pessoas em todo o mundo e causam mais de 750.000 mortes a cada ano, provocando enormes custos nos sistemas de saúde. Isto ocorre uma vez que o grau de desenvolvimento de novos antibióticos é lento quando comparado com a evolução e a disseminação de espécies multirresistentes (1). A nanotecnologia, especialmente o uso de nanomateriais, têm sido amplamente estudados perante a comunidade científica como uma nova ferramenta de combate a este problema. As partículas metálicas e semicondutoras de tamanho nanométrico são de particular interesse porque possuem propriedades óticas, catalíticas e eletrónicas exclusivas quando comparadas aos respetivos materiais vulgarmente designados “*bulk*”. As AgNPs, por exemplo, são distinguidas das nanoestruturas metálicas pelas suas propriedades que incluem a grande condutividade elétrica, estabilidade química, catalítica e atividade antibacteriana (2). Este tipo de partículas têm sido amplamente estudadas em matrizes poliméricas para obtenção de materiais e revestimentos antimicrobianos importantes para evitar a disseminação de infeções em dispositivos médicos. No entanto, a matriz polimérica é normalmente usada como plataformas simples que não respondem pela atividade antimicrobiana do material. Novos materiais ativos que também interagem com células bacterianas podem ser um grande avanço no combate a este problema.

Sabe-se que a sensibilidade das células (tanto eucarióticas como procarióticas) permite detetar estímulos físicos e traduzi-los em respostas biológicas e bioquímicas num processo denominado mecanotransdução. Este tipo de conhecimento tem sido uma ferramenta valiosa para o desenvolvimento de materiais ativos com características específicas à sua superfície e com aplicações na medicina regenerativa e recentemente em abordagens antimicrobianas. Um estudo recente do grupo de investigação onde este trabalho foi desenvolvido provou que o comportamento das células bacterianas que crescem sobre filmes de poli (fluoreto de vinilideno) (PVDF) pode ser adaptado de acordo com a carga superficial do material e a aplicação de um campo elétrico fraco promovido pelo polímero piezoelétrico sob estímulos mecânicos, demonstrando um comportamento diferente entre bactérias Gram-positivas e Gram-negativas(3). Diferentes efeitos

como a inibição do crescimento, efeito "*antifouling*" e biofilme, principalmente em bactérias Gram-positivas foi observado.

Os polímeros piezoelétricos são materiais de grande interesse que geram cargas superficiais variáveis quando uma tensão mecânica é aplicada. Assim, é criado um microambiente eletricamente ativo na superfície do material, de modo a promover a proliferação e adesão de células eucarióticas. Essas propriedades devem-se ao fato de esses materiais poderem ser adaptados não apenas para ser passivamente tolerados pelo corpo, mas também para fornecer o ambiente apropriado para ajudar na resposta celular. Assim, várias estratégias têm sido implementadas para o desenvolvimento de novas estruturas para a regeneração da função tecidual, incluindo o osso, músculo e nervo (4).

No entanto, estudos sobre esses estímulos detectados em bactérias são muito escassos. Mais recentemente, também foi sugerido um mecanismo potencial de ação para a mecanotransdução de *Escherichia coli*. De acordo com a literatura, a despolarização da membrana através da aplicação de voltagem de baixa frequência aumenta o fluxo de cálcio em *E. coli*. Isso possibilita a abertura de "*gates*" através da membrana celular, o que pode ser útil para melhorar a suscetibilidade de bactérias a antibióticos ou então para induzir a proliferação das bactérias (3).

Baseado nesta literatura, acredita-se que combinando os efeitos eletroativos do PVDF e a capacidade biocida das AgNPs podemos obter um material capaz de induzir um efeito biocida e antibiofilme em condições dinâmicas, com concentrações muito baixas de agente antimicrobiano. Estas características permitirão desenvolver materiais que ajudam a prevenir a resistência antimicrobiana, o que constitui um avanço importante na área da engenharia dos materiais aplicados em microbiologia.

## 1.2 Motivação, objetivos e metodologia

Este projeto de dissertação de tese tem como principal objetivo o desenvolvimento de materiais híbridos mecanoelétricos constituídos por um polímero piezoelétrico, o P(VDF-TrFe) e AgNPs sintetizadas através de um processo de síntese ambientalmente seguro, como uma abordagem inovadora para o desenvolvimento de superfícies bactericidas. Espera-se que, com a aplicação de microambientes eletricamente ativos em bactérias "modelo" Gram-negativas e Gram-positivas juntamente com o efeito bactericida das AgNPs haja inibição do crescimento bacteriano

ou mesmo a sua morte, sem induzir o stress nas bactérias e consequentemente a possibilidade de resistência. O efeito sinérgico entre um agente antimicrobiano, como AgNPs e o material eletroativo poli (fluoreto de vinilideno-co-trifluoretileno) (P(VDF-TrFe)) na forma de filme polimérico, na presença de um estímulo mecânico é, portanto, o principal objetivo do trabalho. Para alcançar este objetivo os seguintes objetivos técnicos foram definidos para avaliar os diferentes efeitos do material P(VDF-TrFe) sobre as bactérias: i) em condições estáticas, isto é, sem o estímulo mecânico e levando em consideração o único efeito das diferentes morfologias relacionadas com os diferentes tamanhos dos poros; ii) em condições dinâmicas, isto é, avaliar o efeito mecanoelétrico, devido à aplicação do biorreator mecânico; iii) o efeito biocida da prata e iv) o efeito sinérgico entre o efeito mecanoelétrico e biocida.

Durante a execução do trabalho de modo a cumprir os objetivos mencionados anteriormente, foi implementada a seguinte metodologia:

- Síntese de AgNPs recorrendo a um processo de síntese sustentável;
- Determinação da biocompatibilidade e capacidade antimicrobiana das AgNPs;
- Desenvolvimento de materiais compósitos eletroativos e antimicrobianos, nomeadamente filmes de poli (fluoreto de vinilideno) (PVDF) e poli (fluoreto de vinilideno-co-trifluoretileno) (P(VDF-TrFe));
- Utilização do biorreator mecânico para aplicação dos estímulos mecânicos aos materiais desenvolvidos;
- Avaliação físico química, morfológica e térmica dos materiais desenvolvidos;
- Avaliação da eficácia antibacteriana dos materiais desenvolvidos, e no caso dos últimos na presença e ausência de estímulo mecânico assim como na presença e ausência de AgNPs;

### 1.3 Organização da Dissertação

O projeto de tese está organizado em cinco secções: Introdução, Estado de Arte, Materiais e Métodos, Resultados e Discussão e Conclusão.

Na primeira secção é feito um pequeno enquadramento teórico do trabalho executado. De seguida, é descrita a motivação para a realização do trabalho assim como os objetivos propostos e a estrutura da dissertação.

A segunda secção apresenta uma pesquisa bibliográfica sobre as áreas em que o trabalho se insere. Esta está dividida em vários subcapítulos onde são apresentados os conceitos fundamentais nas áreas de antimicrobianos, biomateriais e polímeros piezoelétricos.

Na terceira secção são apresentados os materiais, reagentes e solventes utilizados na preparação de todo o trabalho experimental e descritos os procedimentos experimentais adotados durante a realização do trabalho. Adicionalmente, é também apresentada uma breve descrição teórica de cada umas das técnicas de caraterização utilizadas. As metodologias relativas aos ensaios realizados são também apresentadas ao longo desta secção.

Na quarta secção são apresentados e discutidos os resultados experimentais obtidos quer na caraterização dos materiais desenvolvidos bem como nos ensaios antimicrobianos realizados.

Por último, na quinta secção são apresentadas as conclusões mais relevantes e gerais desta dissertação. É realizado um balanço do cumprimento dos objetivos delineados na secção inicial, e sugerido um conjunto de propostas de trabalho futuro.



## 2. ESTADO DA ARTE

---

## 2.1 Relevância dos microambientes de células bacterianas

As células vivas possuem a capacidade de responder a uma série de sinais químicos, bioquímicos, biológicos e físicos, que individualmente ou combinados, são capazes de melhorar as funções celulares como a adesão, proliferação, migração e diferenciação (5). De acordo com os estudos reportados na literatura e efetuados recentemente sobre o efeito dos estímulos físicos na compreensão e adaptação sensorial a nível bacteriano, sabe-se que as bactérias sentem e sintonizam-se com forças mecânicas, por exemplo vibração ou fluxo de líquidos, induzindo um comportamento adaptativo relativamente ao ambiente circundante (1). Um exemplo claro de como as bactérias são influenciadas pela natureza mecânica do ambiente envolvente é a *Neisseria gonorrhoeae* (*N. gonorrhoeae*), a bactéria causadora da gonorreia. Esta bactéria possui à superfície um pili do tipo IV, que permite exercer à sua volta forças físicas na ordem dos nanonewton, a mesma amplitude de força que as células de mamíferos exercem na superfície do seu próprio microambiente. As forças exercidas pelas células *N. gonorrhoeae* desencadeiam a acumulação de actina e outras proteínas, eventos críticos para a colonização do hospedeiro (6). Recentemente, foi sugerido um potencial mecanismo de ação para a mecanotransdução da *E. coli*, indicando que esta bactéria pode detetar o ambiente mecânico local através do fluxo de iões cálcio induzido por tensão, gerando um pulso elétrico (7).

As bactérias são descritas como organismos extraordinários, reivindicados como uma das formas de vida dominantes no planeta. Ocupam uma ampla variedade de nichos ecológicos no nosso planeta e foram os primeiros organismos relatados no registo fóssil (8). As bactérias são organismos únicos e simples e, portanto, é notável a sua capacidade de adaptação a diferentes ambientes, tolerando uma grande variedade de temperaturas, pressões e pHs. Além disso, apresentam a capacidade de adquirir resistência como mecanismo de sobrevivência. A história evolutiva destes organismos acompanhada de uma grande exposição a diferentes ambientes físico químicos, tornou-os organismos multifuncionais capazes de detetar e responder a uma ampla gama de sinais como químicos, térmicos, mecânicos, elétricos e magnéticos (1).

Assim, esse comportamento adaptativo tem sido uma ferramenta valiosa para o desenvolvimento de novas estratégias eficazes de controlo de infeções ou para potencializar as vantagens de bactérias benéficas. Ao simular o microambiente da célula bacteriana, o

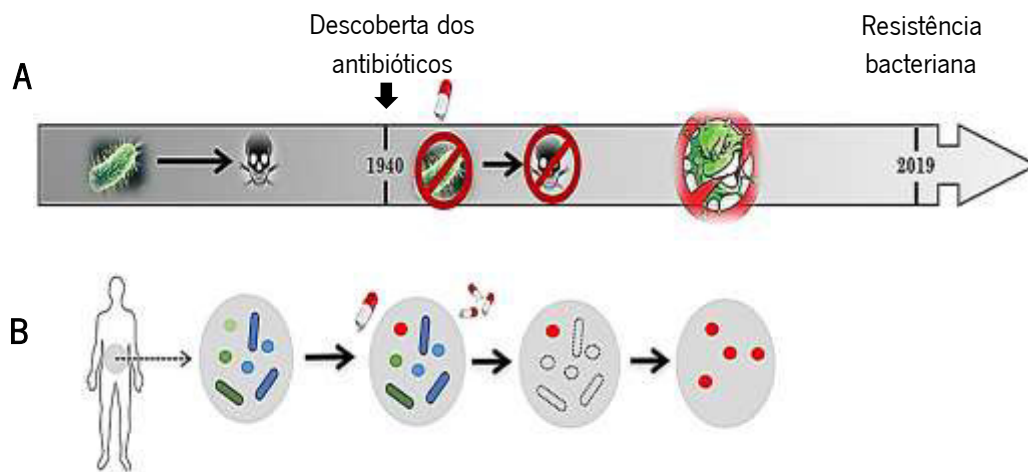
comportamento deste tipo de células pode ser ajustado para abordagens anti ou pró-microbianas (1).

## 2.2 Resistência antimicrobiana

A descoberta da penicilina e a sua aplicação na prática médica em meados do século passado salvou inúmeras vidas e teve um profundo impacto na qualidade da vida humana (9). Este medicamento revolucionário erradicou muitas doenças causadoras de infecções, incluindo tuberculose, doenças transmitidas por alimentos, entre muitas outras, indicando o início da era dos antibióticos (Figura 2.1A).

No entanto, o uso generalizado, persistente e indevido de antibióticos em todo o mundo levou a um aumento alarmante da incidência de bactérias resistentes (10). As infecções bacterianas causadas por estirpes resistentes a antibióticos e a falta de novos medicamentos para substituir os antigos é uma crescente preocupação de saúde pública de acordo com a Organização Mundial de Saúde (OMS) (1). O aparecimento de espécies bacterianas perigosas como *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina (MRSA do inglês *Methicilin Resistant Staphylococcus aureus*) e enterococos resistentes à vancomicina têm sido fortemente relatados. Deste modo, se nenhuma ação for tomada para combater este problema de saúde, a resistência antimicrobiana poderá causar a falha de muitos antibióticos, tornando-se uma das maiores ameaças à saúde humana (11). Estimativas da Agência Europeia do Medicamento e do Centro Europeu de Prevenção e Controlo das Doenças ditam um número de 25.000 mortes por ano como consequência direta de uma infecção por resistência a múltiplos antibióticos. Dados da Organização Mundial de Saúde (OMS) estimam que, em todo o mundo, 3.7% dos novos casos e 20% dos casos previamente tratados apresentam resistência a múltiplos fármacos (12, 13). Além disso, já foram registadas mudanças no padrão de suscetibilidade e na tendência de disseminação da resistência antimicrobiana. Atualmente, a resistência aos antibióticos já é e deve ser uma preocupação de saúde pública e, por isso, são necessárias novas estratégias de combate à resistência antimicrobiana. Medidas como o uso racional de antibióticos, normas de higiene, vacinação, diagnóstico, tratamento eficaz de infecções e boas práticas da microbiologia são alguns dos aspetos que podem ajudar no combate a este problema (13).

O intestino humano é considerado o habitat de muitos micróbios diferentes, alguns com resistência aos antibióticos aos quais estão expostos. Muitas das estirpes resistentes por vezes disseminam-se de pessoa para pessoa, nas comunidades ou nos hospitais levando ao problema da resistência bacteriana (Figura 2.1B). Sabe-se que o corpo humano é constituído por 100 biliões de células, mas apenas 1 em cada 10 é realmente uma célula humana. As células restantes são microrganismos como bactérias (1). Contudo, sabe-se que esses microrganismos são inofensivos e vivem em perfeito equilíbrio com o corpo humano, desempenhando um papel importante no auxílio e na manutenção de funções vitais, por exemplo, no nosso sistema imunológico e digestivo (14). Porém, quando esse equilíbrio é quebrado e os ecossistemas que as bactérias produzem em diferentes partes do corpo humano são interrompidos, as bactérias tornam-se patogénicas, causando doenças infecciosas. Deste modo, as abordagens pró-microbianas, constituem uma estratégia importante que deve chamar a atenção da comunidade científica (1).



**Figura 2.1.** Representação esquemática de **(A)** linha do tempo para o desenvolvimento da resistência bacteriana e **(B)** impacto dessa resistência na flora natural presente no intestino humano. Antes da descoberta da penicilina em 1940, as infeções causadas por bactérias matavam milhões de pessoas, mas o microbioma do nosso intestino apresentava inúmeros micróbios inofensivos. Após 1940, o aparecimento de antibióticos permitiu curar doenças anteriormente mortais e salvou uma grande quantidade de vidas. No entanto, a aplicação constante de antibióticos resultou no aparecimento de estirpes resistentes a antibióticos. Os micróbios inofensivos da flora intestinal também foram mortos, dando lugar à proliferação de estirpes resistentes. Adaptado de (1).

### 2.2.1 Equilíbrio antimicrobiano e pró-microbiano

Apesar de frequentemente estarem associadas a virulência, infeções e doenças, as bactérias são consideradas microrganismos muito importantes para assegurar a vida humana, uma vez que são responsáveis pelo correto funcionamento do nosso sistema imunológico,

respiratório e digestivo. De acordo com esta abordagem, é importante obter estratégias pró-microbianas eficazes no controlo de infeções, reforçando a população microbiana benéfica presente no nosso organismo (microbioma) e, ao mesmo tempo, a erradicação completa de bactérias patogénicas sem a possibilidade de desenvolver resistência (estratégia antimicrobiana) (1). O equilíbrio entre estas duas abordagens, antimicrobiana e pró-microbiana, é por isso uma estratégia bastante importante para limitar a resistência bacteriana (15).

No entanto, as estratégias dominantes para o combate a este problema têm sido fortemente focadas na inovação de medicamentos enquanto que os benefícios do microbioma humano são vastamente descartados pela comunidade científica. Recentemente, os benefícios que advêm da diversidade de micróbios benéficos foram realçados, enquanto que os antibióticos têm sido descritos cada vez mais como recursos não renováveis (15). De todos os antibióticos disponíveis no mercado atualmente, a classe mais recente foi descoberta em meados de 1980, o que demonstra a dificuldade no processo de desenvolvimento de novos antimicrobianos eficazes. Assim, perante a necessidade de desenvolver novos antibióticos e dando especial atenção à diversidade de micróbios presentes no corpo humano, que auxilia a erradicação de bactérias nocivas, podemos estabelecer um equilíbrio entre estratégias antimicrobianas e pró-microbianas (1).

De acordo com a literatura, o transplante microbiota fecal é uma estratégia pró-microbiana que tem ganho a atenção da comunidade médica e científica. Esta técnica consiste na infusão de bactérias benéficas das fezes de um dador saudável num recetor com uma doença relacionada com um microbioma intestinal pouco saudável. O transplante microbiota fecal foi usado com sucesso no tratamento de infeções causadas por *Clostridium difficile*, um bacilo Gram-positivo comensal do trato intestinal responsável por doenças gastrointestinais associadas a antibióticos (16). Deste modo, sugere-se que o tratamento de doenças infecciosas poderá futuramente ser tratado com recurso a estratégias pró-microbianas como o transplante microbiota fecal. Os desafios futuros desta tecnologia passam pela segurança no fornecimento deste tipo de tratamento aos pacientes, sendo fundamental padronizar as metodologias e preparar laboratórios altamente especializados na preparação de amostras. Outro desafio é identificar a eficácia dos medicamentos à base de microbiota e identificar as bactérias específicas responsáveis por esse efeito (1).

No que diz respeito a estratégias antimicrobianas, as mais estudadas são as abordagens sinérgicas cujo objetivo é inibir a patogénese bacteriana, através da combinação de antibióticos

e/ou outros elementos inovadores que auxiliam o efeito antimicrobiano. Estas estratégias por sua vez tentam diminuir o stress evolutivo na população bacteriana e, assim, impedir o aparecimento de mecanismos de resistência. Uma das ferramentas mais importantes para desenvolver novas estratégias passa pela compreensão da patogênese bacteriana e da comunicação intercelular, tanto a nível físico como químico (17). Tendo em conta que as bactérias podem realmente sentir o ambiente circundante e modificar o seu fenótipo como resposta, as principais evidências responsáveis pela adaptação do comportamento bacteriano e, assim, auxiliar a ação dos antibióticos originou estudos sobre o efeito de estímulos específicos sobre bactérias, nomeadamente os sinais mecânicos, magnéticos, elétricos ou bioquímicos.

#### **2.2.1.1 Estudos dos estímulos mecânicos**

O efeito das vibrações mecânicas na adesão, proliferação e virulência na superfície das bactérias tem sido avaliado principalmente para a inibição da formação de biofilmes, este que é um modo protetor de crescimento que confere às bactérias patogénicas maior resistência aos antibióticos convencionais e aos mecanismos de defesa do sistema imunitário (1). Estudos relatam que as ondas acústicas de superfícies geradas a partir de elementos piezoelétricos ativados eletricamente são repulsivas para as bactérias e interferem na adesão e fixação de microrganismos planctónicos em superfícies sólidas (1, 18). Além disso, as cargas de vibração geradas por materiais magnetoelétricos, que possuem propriedades magnetostritivas e que convertem um estímulo magnético numa deformação mecânica, foram encontradas para reduzir significativamente as bactérias aderentes em amostras expostas a diferentes tipos de microrganismos (19) (Figura 2.2A).

### 2.2.1.2 Estudo dos estímulos elétricos

Sabe-se que a aplicação direta de campos elétricos fortes pode originar um efeito bactericida ou proporcionar um meio de prevenção de infecções causadas pela formação de biofilme. Todavia, a capacidade que os campos elétricos apresentam para promover a cicatrização de feridas através da angiogênese e reduzir a carga biológica microbiana na superfície do material já foi comprovada (20).

O mecanismo de morte por ação elétrica envolve um aumento da permeabilidade da membrana celular, conhecido como eletropermeabilização ou eletroporação irreversível. Isto ocorre quando a tensão transmembranar induzida excede a tensão limite da membrana transmembranar, uma vez que o potencial transmembranar em repouso varia de -20 a -200 mV para a maioria das células. Para manter o potencial da membrana em repouso, a bomba sódio-potássio ( $\text{Na}^+/\text{K}^+$ ), bombeia íons sódio para fora da célula e íons potássio para dentro da célula, numa relação precisa ( $3 \text{ Na}^+ / 2 \text{ K}^+$ ) (21). Qualquer perturbação nestas concentrações iônicas pode levar a um valor mais negativo ou menos negativo do potencial da membrana em relação a zero num processo denominado hiperpolarização ou despolarização, respetivamente. Estudos demonstraram que os efeitos da eletropermeabilização por aplicação de campos elétricos de baixa resistência promove o efeito de antibióticos contra bactérias em biofilmes, diminuindo a concentração de antibióticos necessária para causar a morte de bactérias (1).

Por outro lado, os pulsos elétricos de alta resistência parecem resultar num efeito bactericida eficiente em bactérias Gram-positivas e Gram-negativas. Todavia, essas estratégias requerem a aplicação direta de um campo elétrico na solução bacteriana, o que pode não ser recomendável para ensaios em aplicações *in vivo*. Para além dos estímulos mencionados anteriormente, a formação de espécies reativas de oxigénio (ROS do inglês *reactive oxidative species*), como o peróxido de hidrogénio ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) e espécies reativas de nitrogénio (RNS do inglês *reactive nitrogen species*) também foram descritas como um possível mecanismo de ação para o efeito bactericida utilizando um campo elétrico de baixa resistência (22).

Porém, estudos relatam que principalmente o estímulo elétrico confere efeito bactericida e bacteriostático ao invés de um efeito de proliferação. Contudo, ensaios também demonstram que estímulos mecânicos de baixa frequência levam a variações na carga superficial, induzindo efeito semelhante aos que ocorrem nas células eucarióticas, ou seja, proliferação. Isto, sugere que

estamos perante um efeito que é dependente das condições dos estímulos físicos aplicados (1, 23) (Figura 2.2B).

#### 2.2.1.3 Estudo dos estímulos magnéticos

Cientistas referem que o campo magnético pode interferir no mecanismo de transporte de iões utilizando proteínas dos canais de membrana, levando ao desequilíbrio osmótico e à rutura da membrana. Este fenómeno é atribuído à anisotropia diamagnética causada pelo grande número de proteínas na membrana das células bacterianas, que resultam de resíduos específicos de aminoácidos contendo grupos aromáticos. Resumidamente, os lípidos e proteínas dos canais iónicos presentes na membrana bacteriana sofrem alterações conformacionais que levam à disfunção dessas proteínas, interrompendo os mecanismos essenciais de transporte de iões nas bactérias. Tanto os campos eletromagnéticos de baixa frequência, os campos magnéticos de alta frequência e os campos magnéticos estáticos de intensidade moderada têm provado induzir efeitos bacteriostáticos e/ou bactericida. A geração de radicais livre mediante a aplicação de um campo magnético levando ao stress oxidativo das células bacterianas, foi outro mecanismo de ação proposto envolvido na morte bacteriana e possivelmente em danos nas células de mamíferos (24). Porém, o efeito carcinogénico causado por campos magnéticos de baixa e alta frequência em células e tecidos de mamíferos tem sido alvo de pouca pesquisa e, por isso, mais estudos precisam de ser realizados para avaliar o potencial dano que esta abordagem pode induzir nos sistemas biológicos (25) (Figura 2.2C).

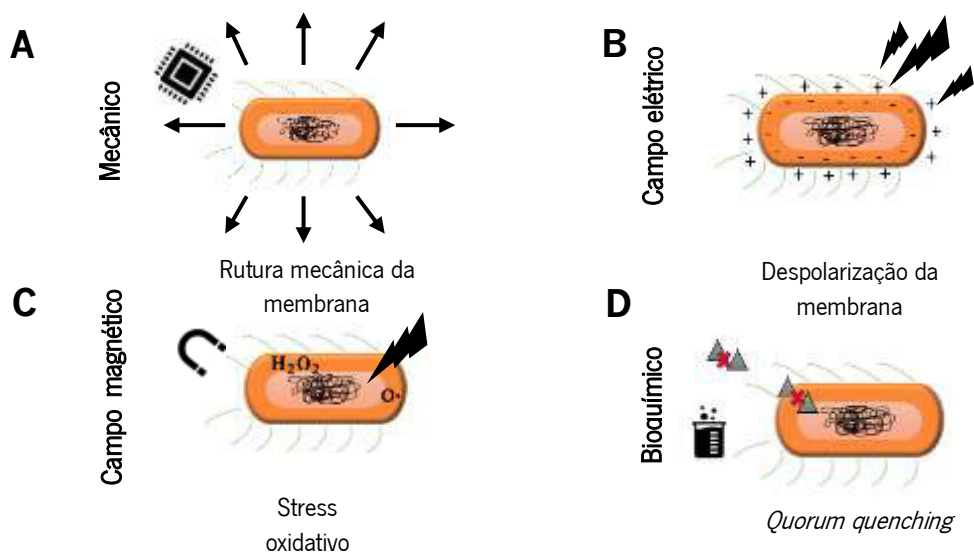
#### 2.2.1.4 Estudo dos estímulos bioquímicos

Um dos exemplos mais importantes que as bactérias utilizam para perceber o seu ambiente circundante e expressar fatores de virulência é o mecanismo de *quorum sensing* que permite regular o comportamento de toda a população incluindo a formação de biofilme. Este mecanismo de comunicação celular é baseado na produção, secreção e deteção de pequenas moléculas de sinalização, denominadas auto indutoras. Na comunicação regulada por *quorum sensing*, as bactérias secretam as moléculas de sinalização (moléculas auto indutoras) que são reconhecidas por recetores específicos, permitindo que as bactérias atuem como um microrganismo multicelular. A inativação dos sinais de *quorum sensing* ocorre através de um



processo chamado *quorum quenching* e que é visto como sendo uma estratégia inovadora para o controle de infecções bacterianas. Com base no conhecimento sabe-se que, por exemplo, a enzima acilase e lactonase têm demonstrado degradar seletivamente os sinais da lactona N- acil-homoserina (molécula sinalizadora envolvida na detecção do *quorum* bacteriano) de bactérias Gram-negativas (1). Assim, a acilase tem sido utilizada com sucesso no revestimento de dispositivos médicos recorrendo a técnicas de funcionalização nomeadamente *layer-by-layer*. O revestimento de multicamadas enzimáticas visa reduzir a carga bacteriana e a formação de biofilme em dispositivos médicos como cateteres urinários funcionalizados á base de silicone (26). De acordo com a literatura esta técnica já foi avaliada em modelos de bexiga cateterizada *in vitro* e *in vivo* usando um modelo animal (coelho), onde o *quorum quenching* e o conjunto de enzimas degradantes da matriz mostraram atrasar o crescimento do biofilme em 7 dias (27). O tipo de revestimento enzimático *quorum quenching* utilizado neste estudo é descrito como totalmente biocompatível, uma vez que foi testado em células de mamíferos como fibroblastos durante um período de 7 dias, o tempo de vida usual de um cateter urinário no paciente e, não foi registada qualquer taxa de toxicidade (1).

A principal vantagem desta abordagem passa por atenuar a virulência, exercendo menos pressão seletiva sobre as bactérias e reduzindo o risco de desenvolvimento de resistência a medicamentos. Deste modo, afeta o comportamento bacteriano, mas não mata ou inibe o seu crescimento permitindo que o sistema de defesa do hospedeiro aumente consideravelmente o efeito de antibióticos. Por outro lado, a ação destas enzimas cria condições para erradicar a infeção através do sistema imunológico do hospedeiro antes que a virulência seja estabelecida (28) (Figura 2.2D).

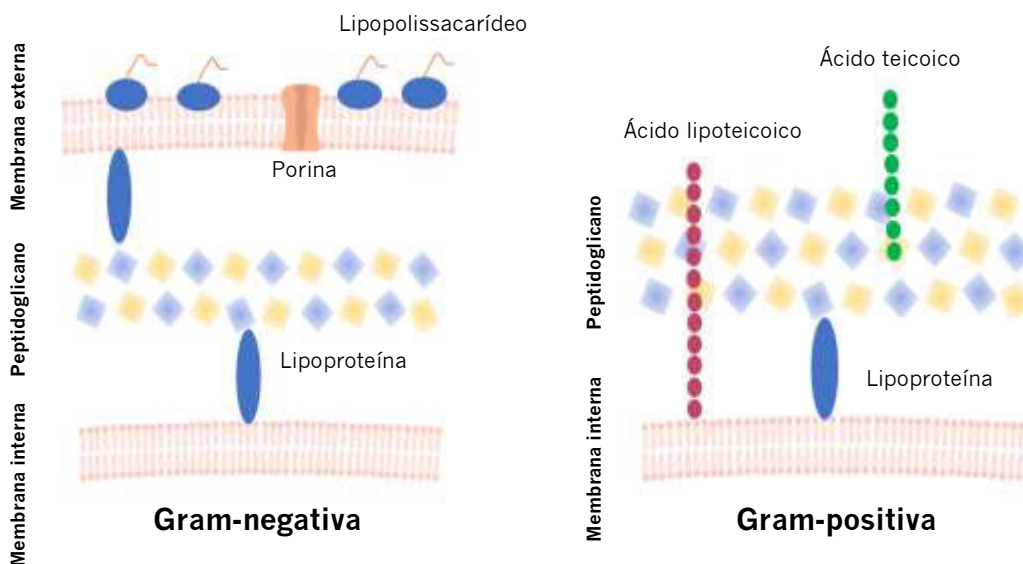


**Figura 2.2.** Estímulos detetados pelas bactérias e respetivo mecanismo de ação para cada efeito bactericida. Estímulo: **(A)** mecânico; **(B)** elétrico; **(C)** magnético e **(D)** bioquímico.

### 2.2.2 Interação bacteriana com a superfície

As bactérias são organismos simples, com uma capacidade notável de sobrevivência, adaptando-se a diferentes ambientes, resultado da sua longa história evolutiva. Estas dividem-se em Gram-positivas e Gram-negativas tendo cada uma delas diferentes características. As bactérias Gram-positivas são constituídas por uma parede celular contínua com 20-80 nm de espessura composta por peptidoglicanos tipicamente designados de mureína. Os peptidoglicanos contêm um esqueleto de glicano altamente reticulado com oligopéptidos. A parede celular das bactérias Gram-negativas possui 5-10 nm de espessura que contém uma monocamada de peptidoglicanos. O espaço periplasmático, a presença de porinas e a existência de pili está presente em bactérias Gram-negativas e ausente nas Gram-positivas (29). A presença de ácido teicóico é característico da membrana celular de bactérias Gram-positivas (Figura 2.3). No que diz respeito ao corpo basal do flagelo, as bactérias Gram-positivas contêm dois anéis e as bactérias Gram-negativas possuem quatro anéis (30). A grande espessura da parede celular das bactérias Gram-negativas permite

que as bactérias coram de vermelho durante a coloração de Gram enquanto que as Gram-positivas adquirem coloração azul violeta (3, 31).



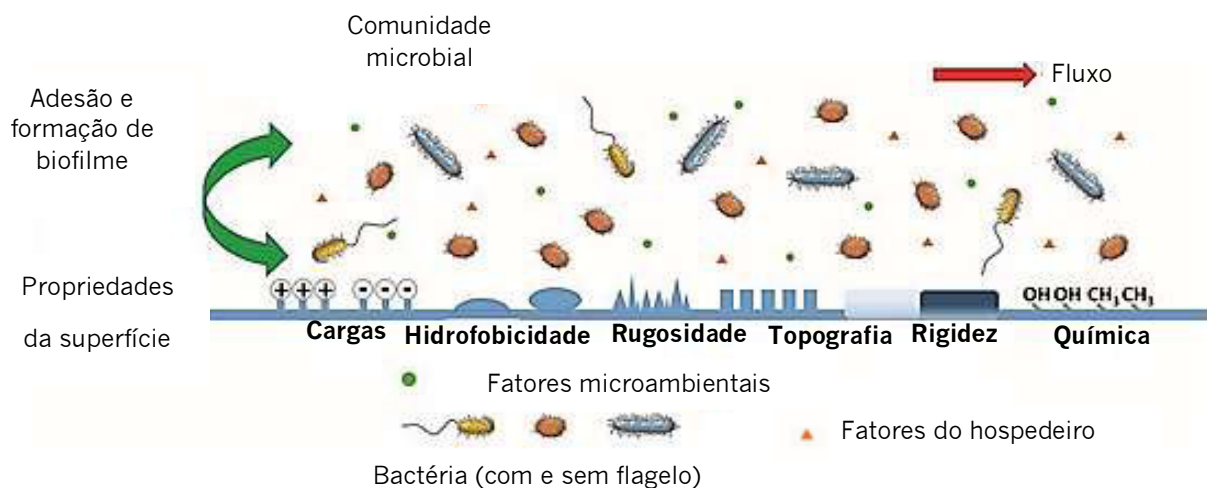
**Figura 2.3.** Diferenças estruturais na parede celular de bactérias Gram-negativas e Gram-positivas.

A adesão a superfícies bacterianas oferece vantagens uma vez que a fixação em superfícies horizontais estimula o crescimento bacteriano, dado o material orgânico suspenso em líquidos depositar-se sobre superfícies aumentando a concentração local de nutrientes (32). Da mesma forma que aumenta a concentração local de nutrientes também aumenta a área de superfície do substrato permitindo que as células cresçam em concentrações de nutrientes que normalmente seriam muito baixas para suportar o seu crescimento. Além da fixação da superfície que facilita a captura de nutrientes, algumas bactérias obtêm metabolitos e cofatores necessários diretamente da superfície à qual aderem. As bactérias ligadas à superfície geralmente existem como biofilmes, que desempenham vários papéis protetores. Estudos, sugerem que a fixação na superfície facilita a resistência a antibióticos por dois mecânicos primários que passam por reduzir a carga negativa líquida nas células bacterianas e aumentar a estabilidade da membrana. Existem três regiões fluidicas passíveis de serem ocupadas por bactérias. Uma região onde as células não sentem o efeito da superfície, uma região próxima da superfície onde as células sentem os efeitos hidrodinâmicos da superfície e por último uma região restringida próxima da superfície em que as células sentem os efeitos hidrodinâmicos e físico químicos da superfície. De acordo com a literatura, a baixa velocidade fluidica, as bactérias não móveis aderem à superfície ao passo que

a alta velocidade as bactérias não móveis são transportadas através do peso dos materiais e não se ligam (33). As bactérias móveis fixam-se à superfície independentemente da velocidade. Após contacto com a superfície, a fixação inicial é reversível, ocorre rapidamente e envolve interações hidrodinâmicas e eletrostáticas. Durante este período, a força adesiva entre as bactérias e a superfície aumenta rapidamente. No que diz respeito à ligação irreversível esta ocorre numa escala de tempo de várias horas e envolve interações de van der Waals entre as regiões hidrofóbicas da parede celular externa e a superfície. A ligação irreversível também é facilitada pela produção de substâncias poliméricas extracelulares que ancoram as células à superfície (34-36).

A termodinâmica desempenha um papel central na regulação da ligação de bactérias a superfícies. As células ligam-se preferencialmente a materiais hidrofílicos (materiais com grande energia superficial) quando a energia superficial da bactéria é maior do que a energia superficial do líquido no qual estão suspensas. Como a energia superficial das bactérias é tipicamente menor do que a energia superficial dos líquidos em que as células estão suspensas, ligam-se por isso aos materiais hidrofóbicos (Figura 2.4) (35).

A ligação bacteriana a superfícies é uma problemática em vastas áreas, incluindo implantes médicos, sistemas de purificação de água e processos industriais. As bactérias são capazes de se fixar numa variedade de diferentes materiais incluindo vidro, alumínio, aço inoxidável e polímeros orgânicos. As bactérias também se ligam a superfícies que inicialmente resistem à fixação celular. Este processo ocorre através da deposição de uma camada de proteínas, incluindo proteínas encontradas naturalmente no ambiente, bem como aquelas secretadas por bactérias que condicionam a superfície e mascaram grupos funcionais que reduzem a adesão celular. A formação de camadas condicionantes é, portanto, um desafio para criar superfícies resistentes a bactérias. Atualmente, têm sido descritas várias estratégias para reduzir a adesão de bactérias, incluindo o controlo da química superficial e o controlo de propriedades estruturais de superfícies. As superfícies com propriedades zwitteriônicas e superfícies impregnadas de prata estão entre as estratégias químicas mais eficazes para inibir a fixação de bactérias nas superfícies (35, 37).



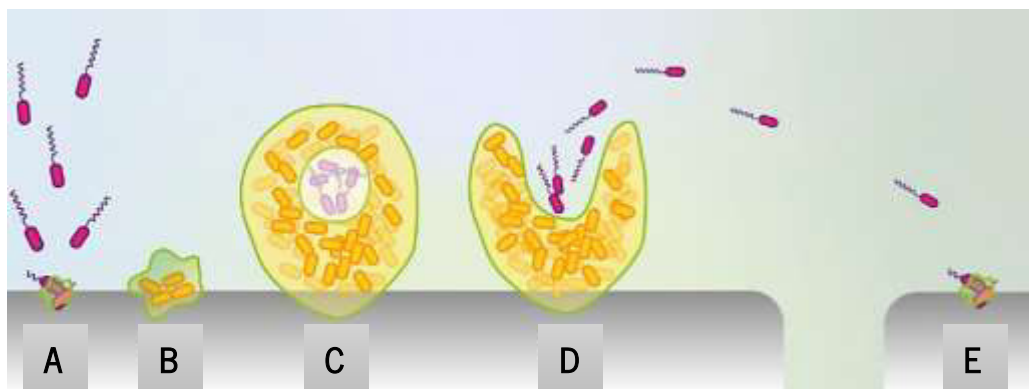
**Figura 2.4.** Ilustração esquemática da adesão bacteriana e dos efeitos das propriedades do material em ambientes complexos. Os efeitos representados são: efeito de carga de superfície, hidrofobicidade, rugosidade, topografia e rigidez. Adaptado de (37).

### 2.2.3 Formação de biofilme

A existência de bactérias à superfície e a subsequente produção de substâncias poliméricas extracelulares promovem a formação de comunidades multicelulares integradas, dinâmicas e estruturalmente complexas designadas de biofilmes. As consequências negativas dos biofilmes incluem o seu papel no desenvolvimento de infecções (38). A prevalência destes organismos e a sua patogenicidade relativamente a infecções encontra-se diretamente ligada à capacidade que os microrganismos têm em colonizar sob superfícies. A complexidade química, física, biológica e dinâmica dos biofilmes é nos dias de hoje uma fonte de preocupação perante a comunidade científica dada a sua baixa suscetibilidade a agentes antimicrobianos. Os microrganismos existentes em biofilmes são encontrados numa ampla variedade de ambientes inclusive de assistência de saúde como em feridas infetadas, implantes e cateteres médicos. O desenvolvimento e a descoberta de novos antimicrobianos tem sido alvo de pesquisa nos últimos anos como já referido. Contudo, recentemente o potencial uso de nanopartículas para erradicar estes microrganismos começou a ser amplamente estudado (39, 40).

A formação de biofilmes pode ser entendida como um modo de crescimento que fornece proteção às células, permitindo que elas sobrevivam em ambientes hostis. Essa formação pode ser influenciada por fatores celulares, superficiais e ambientais. Esses fatores incluem o tipo de espécie microbiana, disponibilidade de nutrientes, composição e rugosidade da superfície, temperatura, hidrodinâmica e hidrofobicidade. Uma das principais fases de formação do biofilme

é a produção da matriz que fornece suporte e proteção às comunidades microbianas que são compostas por substâncias poliméricas extracelulares (Figura 2.5) (39, 41). Na maioria dos casos, a matriz compreende 90% da massa do biofilme, sendo os microrganismos responsáveis pelos restantes 10%. Embora a composição física e química da substância polimérica extracelular varie entre espécies, esta é composta essencialmente por polissacarídeos, proteínas, lipídios e ADN extracelular e compreende uma rede de diversas macromoléculas (39, 42, 43).



**Figura 2.5.** Ciclo de vida do biofilme. **(A)** Fixação/adesão das bactérias à superfície; **(B)** Formação de monocamadas e produção de substância polimérica extracelular; **(C)** Formação e proliferação de microcolônias; **(D)** Dispersão do biofilme; **(E)** Início de um novo ciclo de vida. Adaptado de (39).

## 2.3 Compostos antimicrobianos: prata e mecanismos de ação

As nanoestruturas metálicas são objeto de grande interesse por parte da comunidade científica e tecnológica devido às suas diferentes propriedades físicas e químicas quando comparadas com os materiais vulgarmente designados de “*bulk*” (44). O seu tamanho à escala nano leva a grandes áreas de superfície específica que afetam propriedades como fusão, coesão e energia superficial. Isto resulta em propriedades mecânicas, óticas, elétricas e magnéticas únicas das próprias partículas e dos compósitos preparados a partir delas (2, 45). A mudança nas propriedades óticas quando o tamanho das nanopartículas é na ordem de décimos de nanómetros resulta da oscilação coletiva dos elétrons na banda de condução num processo designado de ressonância plasmônica de superfície. Este fenómeno é influenciado pelo tamanho, forma e distribuição de nanopartículas, bem como a matriz dos compósitos. Entre as nanoestruturas metálicas, as AgNPs são particularmente interessantes devido às suas propriedades, que incluem grande condutividade elétrica, estabilidade química, atividade catalítica e antibacteriana (2).

A prata é um agente antimicrobiano bem conhecido por ter um amplo espectro de atividade. Segundo a literatura, sugere-se que o comportamento antimicrobiano da prata pode ser alcançado através da libertação de íons  $\text{Ag}^+$ , através da interação entre bactérias e AgNPs e pela formação de espécies reativas de oxigênio (ROS) (46). Atualmente, as propriedades antimicrobianas das AgNPs têm sido aplicadas em diversas áreas como indústria, embalagens alimentares, implantes e dispositivos médicos e têxteis (47-49). Com a ajuda das tecnologias aprimoradas, é possível incorporar substâncias bioativas funcionais de modo a aumentar o potencial antimicrobiano como solução potencial para combater microrganismos multirresistentes. Quando comparada aos antibióticos atuais, a prata atua contra microrganismos, fixando a membrana celular e penetrando no seu interior (50). As nanopartículas atacam preferencialmente a cadeia respiratória dos microrganismos e a divisão celular. Embora o mecanismo das AgNPs nas bactérias não seja totalmente compreendido, os quatro mecanismos de atividade bactericida apresentada pela literatura incluem: ataque direto e danos na membrana celular, geração de espécies reativas de oxigênio, interrupção na produção de ATP e inibição da replicação do ADN. Muitos fatores podem influenciar o efeito bactericida de AgNPs como o tamanho, forma, dose, carga superficial e revestimento da superfície (51, 52).

Relativamente aos íons de prata, a sua atividade antibacteriana é endossada por danos morfológicos e estruturais que os íons causam nas bactérias. Os íons de prata podem penetrar dentro das bactérias e causar a lise pela inibição da replicação do ADN. As AgNPs são consideradas mais eficazes dado apresentarem alta razão entre a superfície e o volume e poderem interagir diretamente com as bactérias promovendo a sua morte. Os ROS podem ser gerados dentro ou fora da célula e são subproduto do metabolismo dos organismos respiratórios. A formação de ROS leva à síntese de radicais altamente reativos que podem causar o dano mitocondrial do microrganismo, acelerando a morte ou disfunção celular (46).

O desenvolvimento da nanociência proporcionou a possibilidade de controlar o tamanho e a forma das nanopartículas de metais nobres, bem como as suas propriedades de superfície que são pré-requisito para a fabricação de sensores químicos com alta sensibilidade e seletividade, rápida resposta, ampla faixa de deteção e boa estabilidade. As AgNPs recebem especial atenção para uma ampla gama de aplicações, incluindo a deteção de peróxido de hidrogénio, íons cobre, creatinina e ADN (50). Além disso, as propriedades óticas das AgNPs já foram minuciosamente estudadas e, portanto, é bem conhecido que a posição da banda de ressonância do plasmon de superfície e a sua forma são uma boa indicação da “qualidade” das partículas. Deste modo, os

espectros de absorção de amostras sintetizadas podem ser utilizados como sonda para encontrar parâmetros sintéticos que reduzam os iões  $\text{Ag}^+$  evitando a aglomeração de partículas coloidais (46).

Um forte problema no uso de nanomateriais, especialmente nanopartículas de prata, é a libertação de nanopartículas no meio ambiente. A libertação de  $\text{Ag}^+$  a partir de nanopartículas de prata contribui para a eficácia bactericida dessas nanopartículas, contudo, a sua libertação necessita de estar sob controlo. Tipicamente, a redução química do nitrato de prata ( $\text{AgNO}_3$ ) é realizada com boro hidreto de sódio, citrato, ascorbato ou hidrogénio elementar, cuja escolha influencia o tamanho e a forma das AgNPs sintetizadas, sendo o boro hidreto de sódio o redutor que mais auxilia a síntese de AgNPs monodispersas e de tamanho reduzido (menos de 10nm) (53). O uso de tais agentes químicos está associado a riscos biológicos e a riscos de toxicidade ambiental e, por isso o uso de polímeros naturais como quitosano, heparina e dextranos tem sido cada vez mais utilizado (54). Assim, surgiu a síntese de AgNPs utilizando métodos de síntese sustentáveis que fornece até aos dias de hoje resultados apreciáveis para a nanotecnologia e são aceites como ambientalmente seguras e não tóxicas. Este novo método de síntese é baseado nas funções duais do polissacarídeo dextrano. O dextrano é um polissacarídeo solúvel em água com grandes moléculas de monómeros de glicose com ligações predominantemente  $\alpha$ -1,6 usado para reduzir os iões prata em prata metálica e ao mesmo tempo para estabilizar a síntese de AgNPs (55).

## **2.4 Materiais inteligentes e superfícies ativas para adaptar respostas bacterianas**

Nas últimas décadas, uma variedade de polímeros com propriedades químicas, físicas e estruturais bem definidas têm emergido como potenciais biomateriais em alternativa aos materiais tradicionais utilizados em diversas áreas tecnológicas. O seu baixo custo, facilidade de processamento, flexibilidade e elevada resistência a nível eletrónico e mecânico fazem dos polímeros um foco de grande interesse (56). Os materiais podem ser divididos em quatro grupos distintos: metais, cerâmicos, polímeros e compósitos. Estes biomateriais apresentam vantagens e desvantagens tal como apresentado na tabela 2.1 (57). Dependendo da natureza/origem, os polímeros podem ser classificados como naturais ou sintéticos (58). Os polímeros de origem natural, como o colagénio, a seda e ácido hialurónico, possuem boas propriedades bioativas, o



que melhora o seu desempenho biológico e conseqüentemente favorece a adesão e proliferação celular. No entanto, não possuem propriedades elétricas e mecânicas favoráveis (56).

**Tabela 2.1.** Vantagens e desvantagens dos diferentes tipos de biomateriais (57).

<b>Materiais</b>	<b>Vantagens</b>	<b>Desvantagens</b>
<b>Metais</b>	Elevada resistência mecânica	Corrosão em meio fisiológico; Propriedades mecânicas diferente dos tecidos biológicos; Baixa biocompatibilidade
<b>Cerâmicos</b>	Elevada biocompatibilidade; Resistência à corrosão; Baixa propriedade térmica e elétrica	Baixa elasticidade; Elevada densidade
<b>Polímeros</b>	Fácil fabricação; Baixa elasticidade e densidade	Baixa resistência mecânica; Facilmente degradável
<b>Compósitos</b>	Inerte; Resistência à corrosão; Elevada biocompatibilidade	Difícil de reproduzir durante a fabricação

Os polímeros sintéticos surgem como alternativa aos polímeros naturais. Estes, para além de serem facilmente manipuláveis, apresentam boas propriedades mecânicas. Desta forma, diversos polímeros sintéticos, como o poli(ácido láctico) (PLA), o poli(L-ácido láctico) (PLLA) ou poli(fluoreto de vinilideno) PVDF, têm sido amplamente utilizados na produção de biomateriais baseados em materiais inteligentes e funcionais (56, 57).

Apesar do PVDF e dos seus copolímeros não serem biodegradáveis, eles são bioestáveis e, portanto, amplamente utilizados. No entanto, para aplicações biomédicas, os polímeros devem atender a vários requisitos, incluindo biocompatibilidade, bioestabilidade e/ou biodegradabilidade para produtos não tóxicos. É por isso que o PLLA e o colagénio, um polímero natural piezoelétrico, estão sendo cada vez mais utilizados como polímeros eletroativos, uma vez que combinam a piezoelectricidade com a biodegradabilidade (1).

Os polímeros inteligentes são materiais capazes de alterar de forma controlada e reprodutível uma ou mais propriedades físico químicas como o tamanho, forma, solubilidade, permeabilidade, propriedades mecânicas e elétricas na presença de estímulos externos (58). Assim, dependendo do mecanismo de transdução, estes podem ser classificados como polímeros não eletricamente deformáveis (quando o estímulo é devido a temperatura, luz ou pH) ou polímeros eletroativos, quando existe um mecanismo eletromecânico envolvido (56). Este tipo de material encontra-se presente em várias aplicações como em áreas ambientais, biomédicas e industriais. (59-61).

Os polímeros eletroativos são os que mais se evidenciam. Para além de serem facilmente manobráveis e possuírem capacidade adaptativa, são capazes de realizar a conversão da energia elétrica em energia mecânica (mecanismo de transdução eletromecânico) e, por esta razão, serem considerados ideais para diversas aplicações como sensores e atuadores, próteses inteligentes, produção de músculo artificial e proliferação celular (56-58, 62). Quando um material é sujeito a uma tensão mecânica ao longo de um determinado eixo, gera-se um sinal elétrico como resposta. Este efeito, que consiste na conversão de energia mecânica em elétrica, é designado efeito piezoelétrico direto. Pode também ocorrer o efeito inverso, isto é, a deformação do material quando sujeito a um campo elétrico (efeito piezoelétrico inverso). Sabendo que os sinais elétricos, em particular os eletromecânicos, são um dos principais estímulos físicos presentes no corpo humano, o efeito piezoelétrico direto terá maior importância para aplicações biomédicas como sensores, e o efeito piezoelétrico inverso como atuadores (63).

A aplicação de um microambiente eletricamente ativo é uma estratégia que tem sido amplamente explorada em células de mamífero em engenharia de tecidos e que também pode ser usada para adaptar respostas bacterianas específicas. Segundo a literatura, os materiais eletroativos como polímeros piezoelétricos, desenvolvem variações de tensão elétrica na superfície do material quando uma tensão mecânica é aplicada, promovendo a adesão e proliferação de células eucarióticas (64). Sabendo que as bactérias também são capazes de detetar estes estímulos, estes materiais parecem ser uma abordagem adequada para aplicações antimicrobianas e pró-microbianas, desenvolvendo superfícies ativas baseadas neste tipo de material (56).

Os materiais mecanoelétricos são materiais constituídos principalmente por, por exemplo, polímeros piezoelétricos que respondem a um estímulo mecânico, induzindo uma variação de

carga elétrica no material. Os estímulos aplicados são induzidos com a ajuda de um biorreator que fornece uma vibração mecânica específica sobre os materiais e, portanto, sobre as células, para estudos de investigação de reposta celular ou sobre revestimento ativo através da funcionalização da superfície de materiais onde esses estímulos estão presentes ou podem ser induzidos, como é o caso dos dispositivos biomédicos.

Em microbiologia, a abordagem destes materiais também pode ser valiosa, por exemplo, para a prevenção de infecções de dispositivos de ortopedia por estimulação externa. Para obter esse efeito, pode usar-se o potencial de materiais eletricamente ativos. Apesar de o desenvolvimento deste tipo de materiais ter sido até agora pouco explorado em microbiologia, o efeito de um forte campo elétrico no comportamento das bactérias, em vez de ondas mecânicas acústicas foi relatado num estudo sobre o efeito de um material piezoelétrico (cerâmica) em bactérias. Este estudo, refere a ocorrência de morte celular devido à formação de ROS (65). Descobertas recentes relatam que o comportamento das células bacterianas, que crescem em polímeros piezoelétricos, pode ser adaptado de acordo com a carga superficial do material e com a aplicação de um campo elétrico fraco, promovido por um polímero piezoelétrico sob estímulos mecânicos, demonstrando comportamentos diferentes entre bactérias Gram-positivas e Gram-negativa (1).

#### **2.4.1 Poli (fluoreto de vinilideno)**

O PVDF e os seus copolímeros são reconhecidos como materiais com inúmeras aplicações em áreas biomédicas devido à sua alta resposta eletroativa dentro dos materiais poliméricos. É um material semi-cristalino, quimicamente inerte, eletricamente ativo e biocompatível (Figura 2.6). Geralmente cristaliza numa estrutura esferulítica constituída por um conjunto de lamelas que crescem radialmente a partir de um centro comum (66). Na figura 2.7 estão representadas duas lamelas que constituem a região cristalina, entre as quais se pode observar a região amorfa do material.

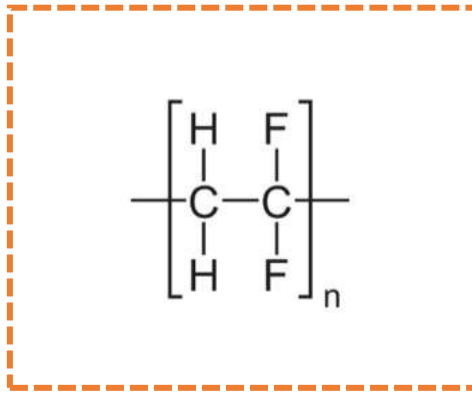


Figura 2.6. Estrutura química do PVDF

Quanto à polaridade, o PVDF é um polímero linear que apresenta dipolos elétricos permanentes, formados pela diferença de eletronegatividade entre átomos de flúor e carbono. Apresenta um polimorfismo pouco comum entre os materiais poliméricos, podendo cristalizar em pelo menos quatro fases cristalinas ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$ ) (67). Isto deve-se às reduzidas dimensões do raio atômico do flúor, que favorece a ocorrência de diferentes tipos conformacionais e, conseqüentemente, diferentes estruturas cristalinas. As diversas conformações referem-se ao arranjo espacial dos átomos de carbono na cadeia polimérica, os quais podem ser alterados por rotações das ligações químicas. Deste modo, o PVDF apresenta as seguintes conformações: *all-trans* (TTT) planar, em *zig-zag* na fase  $\beta$  e TGTG' (*trans-gauche-trans-gauche*) na fase  $\alpha$ . A obtenção de determinadas fases e a interconexão entre elas depende fortemente dos métodos de processamento, bem como do tratamento térmico, mecânico e elétrico a que o material é sujeito (64, 68).

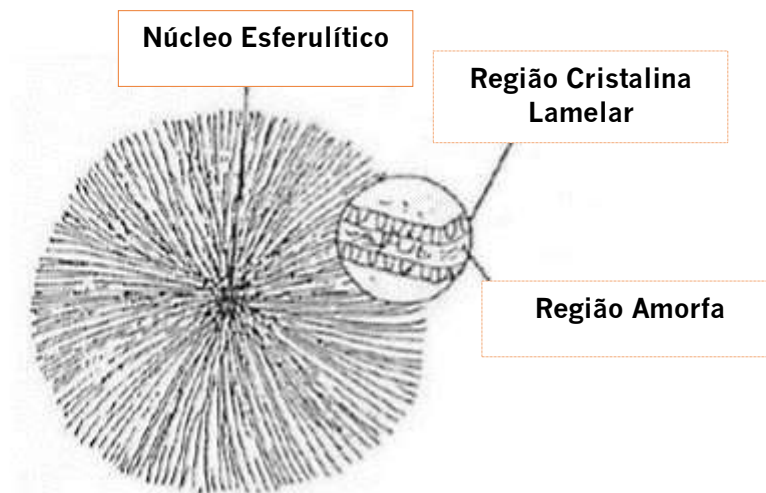
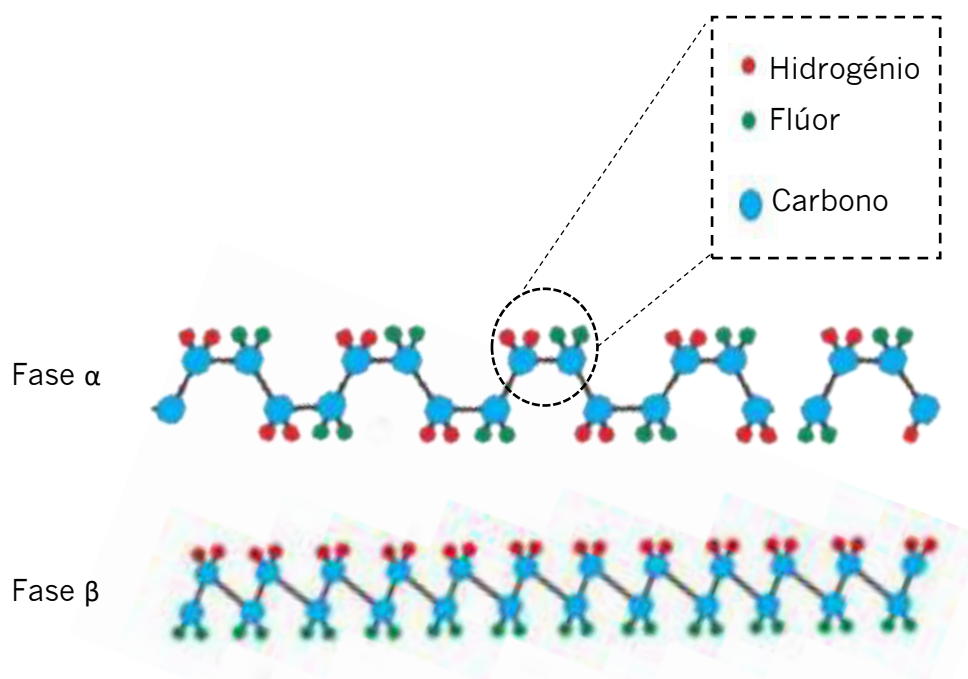


Figura 2.7. Representação esquemática da estrutura esferulítica do PVDF. Adaptado de (69).

A fase apolar  $\alpha$  é a fase cristalina mais comum do PVDF (Figura 2.8). Nesta fase, as cadeias poliméricas organizam-se numa estrutura conformacional do tipo TGTG' onde as moléculas assumem uma conformação helicoidal. Esta disposição permite um maior distanciamento entre os átomos de flúor dispostos ao longo da cadeia (70). No entanto, quando a cadeia polimérica se encontra com esta conformação, o PVDF não apresenta eletroatividade (68). A célula unitária desta fase é formada por duas macromoléculas e é apolar devido ao empacotamento ortorrômbico (71).

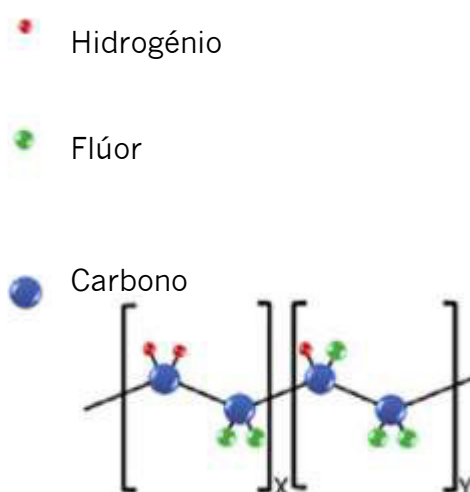
A fase  $\beta$  é a mais ativa do ponto de vista elétrico e desta forma, a mais desejável sob o ponto de vista tecnológico para aplicações como sensor e atuador (Figura 2.8). Embora possa ser obtida por diferentes técnicas, a mais reportada sucede do estiramento mecânico da fase  $\alpha$  a temperaturas inferiores a 100 °C. Nesta fase, todos os átomos de flúor estão diametralmente dispostos aos hidrogénios na cadeia polimérica (configuração *all-trans* (TTT) planar e em *zig-zag*). Esta estrutura configuracional é a chave para as propriedades piezo e piroelétricas apresentadas pelo material, pois o momento dipolar das unidades monoméricas é bastante elevado (72).



**Figura 2.8.** Representação das cadeias  $\alpha$ - e  $\beta$ -PVDF. Adaptado de (72).

#### 2.4.2 Poli (fluoreto de vinilideno-co-trifluoretileno)

O copolímero P(VDF-TrFE) é um material eletroativo, semi-cristalino e biocompatível, que tem despertado grande interesse a nível de aplicações tecnológicas devido às suas interessantes propriedades. Além da sua atividade piezoelétrica e piroelétrica, este copolímero exibe uma transição de Curie ferro-paramagnética abaixo da temperatura de fusão quando contém uma percentagem em mol de VDF entre 50 e 85%, permitindo o estudo da fase de transição ferro-paramagnética. Ao contrário do PVDF, apresenta-se em fase ferroelétrica à temperatura ambiente, independentemente das condições às quais acontece a sua cristalização, ou seja, independentemente do modo de processamento (73). Nesta fase ferroelétrica a cadeia apresenta a conformação mais desejada para aplicações tecnológicas, a *all trans* semelhante à fase polar  $\beta$  do PVDF (Figura 2.9). Para além disso, o P(VDF-TrFE) apresenta uma maior polarização remanescente e maior estabilidade a altas temperaturas (72, 74).



**Figura 2.9.** Representação do copolímero P(VDF-TrFE). Adaptado de (74).

### **3. MATERIAIS E MÉTODOS**

---

### 3.1 Materiais

As nanopartículas de prata (AgNPs do inglês *silver nanoparticles*) foram desenvolvidas utilizando nitrato de prata ( $\text{AgNO}_3$ , 98 % (m/m)) e dextrano. Para os compósitos poliméricos utilizou-se *poly(vinylidene fluoride)* (PVDF) (*Solef 6010*) adquirido na *Solvay*, *poly(vinylidene fluoride-co-trifluoroethylene)* (P(VDF-TrFE)) (70/30 % mol) adquirido na *PiezoTech*, e o solvente dimetilformamida (DMF, 99.5% (v/v)) da *Merck*. A bactéria Gram-positiva *Staphylococcus epidermidis* NCTC 11047 e a bactéria Gram-negativa *Escherichia coli* K12 foram adquiridas na *American Type Culture Collection (LGC Standards S.L.U)* e usadas na realização de todos os ensaios antimicrobianos.

### 3.2 Síntese de nanopartículas

As nanopartículas de prata sintetizadas foram desenvolvidas através da redução do precursor do sal metálico  $\text{AgNO}_3$ , utilizando as funções duais do polissacarídeo dextrano para reduzir os íons prata em prata metálica e ao mesmo tempo estabilizar a síntese das AgNPs. Diferentes concentrações de  $\text{AgNO}_3$  (0.2M, 0.4M e 0.8M) e de dextrano (0.03 %, 0.06 % e 0.12 % (p/v)) foram respectivamente combinadas para obter as nanopartículas de prata (Tabela 3.1), usando a mesma razão  $\text{AgNO}_3$  e dextrano, pois estas são as condições otimizadas para obtenção das nanopartículas (55).

**Tabela 3.1.** Concentrações de  $\text{AgNO}_3$  e dextrano utilizadas na síntese de AgNPs e respetiva nomenclatura atribuída às AgNPs.

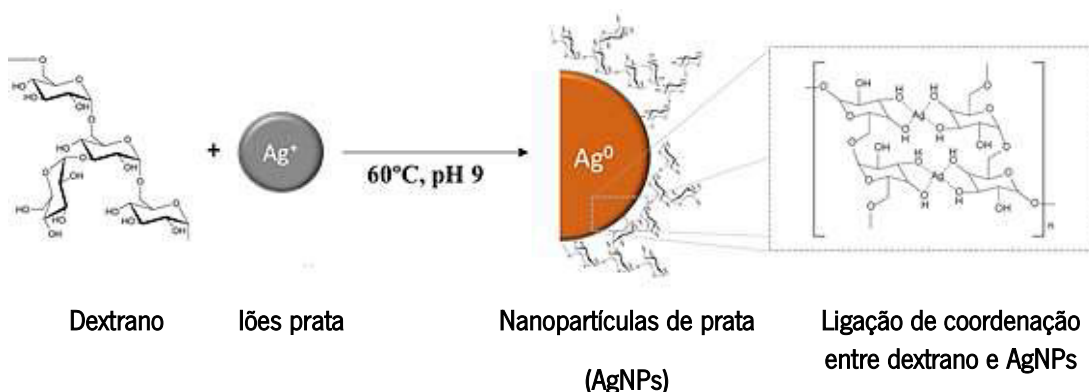
Nomenclatura da amostra (AgNPs)	Concentração	
	$\text{AgNO}_3$	Dextrano (p/v)
0.2Ag0.03Dex	0.2M	0.03%
0.4Ag0.06Dex	0.4M	0.06%
0.8Ag0.12Dex	0.8M	0.12%

Inicialmente, adicionou-se  $\text{AgNO}_3$  a 100 mL de solução de dextrano para cada concentração específica mencionada anteriormente e, em seguida, as soluções foram incubadas a 60 °C com pH = 9 sob agitação com o auxílio de um agitador magnético (*Ika-C-Mag HS7*). Para



ajustar o pH, foi utilizada uma solução de hidróxido de sódio (NaOH). Ao adicionar NaOH ao meio aquoso, é promovida a desprotonação do grupo hidroxila no dextrano que auxilia imediatamente na formação de AgNPs através da formação de uma ligação de coordenação entre as moléculas de dextrano e as nanopartículas (Figura 3.1) (54).

As condições deste procedimento foram estabelecidas com base em trabalhos anteriores e, após o aparecimento da cor amarela, a solução coloidal foi deixada em repouso durante 3 horas (55).



**Figura 3.1.** Representação esquemática do mecanismo de síntese das AgNPs e da ligação de coordenação formada entre moléculas de dextrano e AgNPs.

### 3.3 Caracterização das nanopartículas de prata

#### 3.3.1 Espalhamento dinâmico da luz

O espalhamento dinâmico da luz (DLS do inglês *Dynamic Light Scattering*) é uma técnica não invasiva e bem estabelecida para a medição do tamanho e distribuição do tamanho de moléculas e partículas. Em geral, esta técnica é aplicada na caracterização de partículas, emulsões e moléculas que foram dispersas ou dissolvidas num líquido. O movimento browniano das partículas ou moléculas em suspensão faz com que a luz laser seja espalhada com intensidades diferentes. A análise dessas flutuações de intensidade resulta na velocidade do movimento browniano e assim, o tamanho das partículas é avaliado usando a relação de Stokes-Einstein (75).

Para além da medição do tamanho, o DLS permite tirar conclusões sobre a homogeneidade da amostra através do índice de polidispersividade (PDI do inglês *Polydispersity Index*). O índice de polidispersividade varia entre 0 e 1 consoante a gama de diâmetros

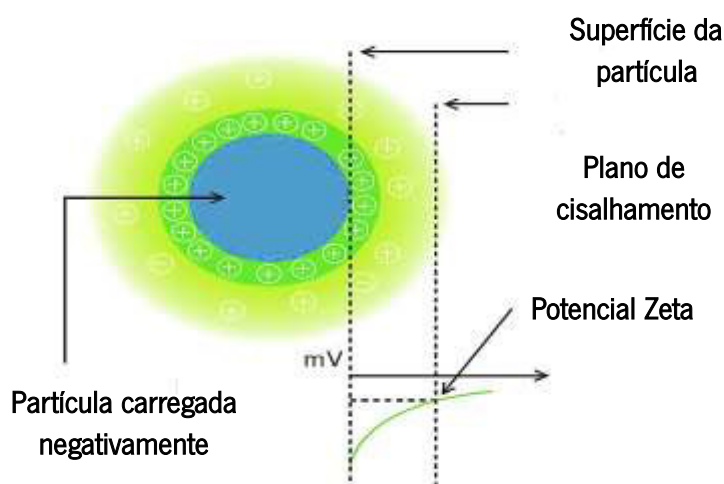
encontrados em relação à média de diâmetros. Quanto maior o intervalo de diâmetros, mais dispare são os tamanhos, o que resulta num PDI elevado (76).

O tamanho hidrodinâmico das AgNPs a 25 °C e pH=9 foi medido por DLS usando o *Zetasizer Nano (Malvern Nano ZS)*. Os dados foram analisados usando o software *Malvern ZetaSizer DTS 7.01* para calcular o diâmetro médio das partículas tendo sido realizadas três replicas de cada amostra em estudo.

### 3.3.2 Potencial Zeta

Em suspensão, as nanopartículas possuem uma carga superficial e, por isso, quando é aplicado um campo elétrico elas movem-se devido à interação entre as partículas carregadas e o campo aplicado. Assim, o potencial zeta tem como função medir o potencial eletrostático na dupla camada elétrica à superfície das nanopartículas (Figura 3.2). As nanopartículas que apresentam um potencial zeta entre -10 mV e + 10 mV são consideradas neutras, enquanto que as nanopartículas com potencial maior que + 30 mV ou menor que - 30 mV são descritas como fortemente catiónicas ou fortemente aniónicas, respetivamente (77).

A estabilidade coloidal das AgNPs foi obtida por espectroscopia de correlação de fótons (PCS do inglês *Photoncorrelation Spectroscopy*) usando o *Malvern Zetasizer NS (Malvern Instruments)* a  $25.0 \pm 0.1$  °C.



**Figura 3.2.** Diagrama da concentração iónica e da diferença de potencial em função da distância da superfície carregada de uma partícula suspensa em meio disperso. Adaptado de (77).

### 3.3.3 Microscopia eletrônica de varrimento

A microscopia eletrônica de varrimento (SEM do inglês *Scanning Electron Microscopy*) é uma técnica de aquisição de imagem que permite a análise e a caracterização morfológica das amostras a uma escala micro e nanométrica (78). O microscópio eletrônico de varrimento é constituído fundamentalmente por: um canhão eletrônico que produz feixes de elétrons; um sistema ótico eletromagnético constituído por um conjunto de lentes convergentes; dois conjuntos de bobinas defletoras que permite a deflexão do feixe eletrônico de forma a efetuar o varrimento da zona de interesse; uma platina que suporta a amostra e possibilita o seu deslocamento por rotação, inclinação e translação, segundo os três eixos e, por último um sistema de deteção (79).

Nesta técnica a amostra a ser analisada é atravessada por um feixe de elétrons que, ao interagir com a sua superfície, vai gerar diferentes sinais que vão ser detetados e convertidos em informação. Estes sinais, que resultam da dissipação de energia que os elétrons sofrem ao atingir a amostra, incluem elétrons secundários (SE do inglês *Secondary Electrons*), elétrons retrodispersos (BSE do inglês *Backscattered Electrons*), elétrons retrodispersos difratados (EBSD do inglês *Electron Backscatter Diffraction*), fótons de raio-X, luz visível e calor. O método mais comum de obtenção de imagens é a deteção de elétrons secundários. Quando estas radiações são detetadas, é possível obter informações sobre a topografia (interação do feixe eletrônico com a amostra obtém-se elétrons secundários), composição química (interação do feixe eletrônico com a amostra obtém-se elétrons retrodispersos – BSE), e elementos químicos que compõem a amostra (interação do feixe eletrônico com amostra obtém-se raio-X) (79, 80). É importante referir que os detetores não estão todos colocados à mesma distância da amostra. Os detetores de elétrons primários (elétrons retrodispersos) estão mais afastados, uma vez que estes elétrons possuem energia e velocidade elevada. Já o detetor de elétrons secundários situa-se próximo da amostra. Este detetor possui uma carga positiva à superfície, capaz de capturar os elétrons secundários, elétrons estes que, são menos energéticos que os elétrons principais (78, 81).

A imagem de SEM forma-se após o varrimento contínuo da superfície pelo feixe de elétrons. Esta imagem pode-se basear apenas na deteção de um só tipo de elétrons emitidos (análise mais rápida) ou pela deteção dos diferentes tipos de radiação (análise mais demorada mas com melhor resolução) (82).

A morfologia das amostras de AgNPs foi visualizada em solução através de equipamento SEM. Estas amostras de nanopartículas de prata, foram aplicadas em *stubs* de alumínio com fita adesiva de carbono condutora. Em seguida, foi realizado um revestimento de ouro/paládio num processo designado *sputtering* que confere condutividade à superfície da amostra. A espessura do recobrimento foi de aproximadamente 2 nm. As amostras foram estudadas usando o equipamento *NOVA Nano SEM 200 FEI*.

### 3.3.4 Atividade bacteriostática das nanopartículas de prata

A suscetibilidade das bactérias às AgNPs desenvolvidas foi avaliada utilizando uma técnica vulgarmente designada de concentração mínima inibitória (MICs do inglês *Minimum Inhibitory Concentrations*). Esta técnica serve para definir qual a menor concentração de um antimicrobiano necessária para inibir o crescimento visível de um microrganismo após incubação (83).

Para a preparação do pré-inóculo bacteriano foram utilizadas colónias celulares bacterianas de *E. coli* e *S. epidermidis*. Estas colónias ficaram em crescimento *overnight* a 37 °C e 110 rpm em caldo nutritivo (NB do inglês *Nutrient Broth*). Neste ensaio foram preparadas diferentes concentrações de AgNPs por diluições em série de uma solução mãe de nanopartículas de prata com uma concentração inicial de 50 % (v/V). O crescimento bacteriano foi monitorizado através do registo da densidade ótica a 600 nm (corrigida para o *background* de cada branco) às 0 horas e 24 horas, utilizando o leitor de microplacas, aplicando a equação 3.1:

$$\text{Viabilidade celular (\%)} = \frac{\text{Abs}_{600\text{nm amostra}}}{\text{Abs}_{600\text{nm controlo}}} \times 100 \quad \text{Equação 3.1}$$

### 3.3.3 Citotoxicidade das nanopartículas de prata

As nanopartículas são consideradas tóxicas para as células de mamíferos e, devido à possibilidade de acumulação das nanopartículas, foram realizados ensaios de avaliação da citotoxicidade. Este ensaio foi realizado com base no teste padrão ISO 10993-5 para estudar a citotoxicidade das AgNPs 0.4Ag0.06Dex. Estas, foram colocadas em contato com o meio DMEM

(do inglês *Minimal Essential Medium*) numa placa de poliestireno para cultura de tecidos de 24 poços durante 24h a 37 °C em condições de 95 % de ar humidificado contendo 5 % de CO<sub>2</sub>. A solução foi então analisada quanto à toxicidade usando o método de ensaio *3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide* (MTT) (84). Este método avalia a viabilidade celular, medindo a atividade mitocondrial das células, que é uma avaliação indireta do número de células viáveis. Resumidamente, as células pré-osteoblásticas MC3T3-E1 foram cultivadas a uma densidade de  $2 \times 10^4$  células.mL<sup>-1</sup> numa placa de poliestireno para cultura de tecidos de 96 poços e encubadas posteriormente durante 24 horas. O meio de cultura foi removido da placa e substituído pelo meio de extração anteriormente em contato com as nanopartículas durante 24 horas. Como controlo positivo, foi utilizado dimetilsulfóxido (DMSO, *Sigma Aldrich*) a uma concentração de 20 % em meio DMEM, enquanto que como controlo negativo foi utilizado o meio de cultura celular. Após 24 horas, o meio de cada poço foi removido e 100 µL de solução de MTT a uma concentração de 10% (v / v) em meio DMEM (solução padrão de 5 mg.mL<sup>-1</sup> de MTT em PBS) foi adicionada a cada poço. As células viáveis convertem o MTT num produto de cor púrpura, que após 2 horas de incubação pode ser medido dissolvendo com DMSO os cristais de MTT formados no interior das células. A densidade óptica foi ainda medida a 570 nm usando um leitor de placas espectrofotométrico (*Biotech Synergy HT*). Todos os resultados quantitativos foram obtidos de cinco amostras e os controlos replicados e analisados como a média de viabilidade  $\pm$  desvio padrão (DP), de acordo com a equação 3.2:

$$\text{Viabilidade celular (\%)} = \frac{\text{Abs}_{570\text{nm amostra}}}{\text{Abs}_{570\text{nm controlo negativo}} \times 100 \quad \text{Equação 3.2}$$

### 3.4 Desenvolvimento de compósitos: Processamento de filmes de PVDF e PVDF/AgNPs

Os nanocompósitos foram produzidos por *Doctor blade*, uma das técnicas de processamento mais utilizada para a produção de filmes de PVDF em superfícies de grande área rígida ou flexível. A espessura do filme é controlada pelo tamanho do espaço entre o espalhador e o substrato e também pela fração de massa do polímero (85).

Para a síntese de filmes de PVDF, o polímero foi dissolvido sob agitação magnética (*Jka-C-Mag HS7*) em N, N- dimetilformamida (DMF) numa proporção de 15/85 % em peso de PVDF/DMF. Durante 15 minutos, foi aplicada uma temperatura de 30 °C, evitando a formação de agregados. O polímero foi completamente dissolvido após aproximadamente 2 horas de agitação até a solução ficar completamente transparente e homogênea. No decorrer deste processo os recipientes que continham as soluções foram selados com parafilme para evitar a evaporação do solvente. A solução de PVDF foi cuidadosamente derramada num substrato de vidro e, com um extensor, o “*doctor blade*”, espalhada uniformemente. Utilizando o extensor de abertura igual a 450 µm foi possível obter filmes com espessura de aproximadamente 50 µm. Para a obtenção de filmes não porosos, o substrato de vidro foi colocado na estufa (*P-Selecta*) a 210 °C durante 10 minutos, permitindo a rápida evaporação do solvente.

Todo este procedimento foi realizado para síntese de filmes compósitos não porosos de PVDF e filmes não porosos de PVDF contendo nanopartículas de prata (PVDF /AgNPs). Os filmes de PVDF /AgNPs produzidos apresentam concentrações de AgNPs igual a 1 % (p/p), 20 % (p/p) e 30 % (p/p). Para os filmes de PVDF/AgNPs, as AgNPs, foram ressuspensas em DMF e colocadas em banho de ultrassons (*FB15056, Fisherbrand*) durante aproximadamente 1 hora, permitindo a dispersão das nanopartículas. Todo o procedimento subsequente foi exatamente o mesmo realizado na produção de filmes não porosos de PVDF.

### 3.5 Caraterização dos compósitos de PVDF e PVDF/AgNPs

#### 3.5.1 Espetroscopia de infravermelho com transformadas de Fourier

A espectroscopia de infravermelho com transformadas de Fourier (FTIR do inglês *Fourier Transform Infrared Spectroscopy*) é uma técnica comumente utilizada na caraterização de materiais poliméricos principalmente para identificação das fases cristalinas presentes nos filmes de PVDF e seus co- polímeros. Baseia-se principalmente na vibração dos átomos de uma molécula utilizando a região do infravermelho (IV) do espectro eletromagnético situado entre os 400 e 4000 cm<sup>-1</sup>. Quando a amostra em estudo é sujeita a este tipo de radiação, existe uma certa fração de radiação incidente absorvida a uma determinada energia, gerando assim um espectro de infravermelho (IV). A energia a que qualquer banda de absorção aparece no espectro de IV

corresponde à frequência de vibração de uma dada ligação química ou grupo funcional na amostra. No entanto, para que ocorra absorção de energia é necessária uma alteração do momento dipolar da ligação química ou grupo funcional em estudo decorrente do seu movimento vibracional ou rotacional. A vibração pode ter origem na alteração do comprimento de ligação, estiramento, variação do ângulo de ligação ou deformação (86, 87).

O espectro de FTIR-ATR do PVDF está bem caracterizado e existem bandas de absorção que identificam claramente as fases  $\alpha$  e  $\beta$  do PVDF tal como apresentado na tabela 3.2 (72).

A fração de fase  $\beta$  presente na amostra de PVDF pode ser calculada recorrendo à equação 3.3:

$$F(\beta) = \frac{A_{\beta}}{(K_{\beta}/K_{\alpha})A_{\alpha} + A_{\beta}} \quad \text{Equação 3.3}$$

onde  $F(\beta)$  representa o conteúdo da fase  $\beta$ ,  $A_{\alpha}$  e  $A_{\beta}$  representa as absorbâncias a 763 e 840  $\text{cm}^{-1}$  correspondente à fase  $\alpha$  e  $\beta$  respetivamente,  $K_{\alpha}$  e  $K_{\beta}$  são os coeficientes de absorção dos números de onda com valores igual a  $6,1 \times 10^4$  e  $7,7 \times 10^4 \text{ cm}^2/\text{mol}$  respetivamente (88).

No presente trabalho, os espectros foram obtidos com recurso ao espectrofotómetro *Spectrum Two™* da *Perkin-Elmer*, que possui um sistema de reflexão total atenuada (ATR do inglês *Attenuated Total Reflection*). Todos os espectros foram adquiridos num intervalo compreendido entre os 650  $\text{cm}^{-1}$  e os 4000  $\text{cm}^{-1}$  à temperatura ambiente. Para cada amostra foram realizados 64 varrimentos com resolução de 4  $\text{cm}^{-1}$ .

**Tabela 3.2.** Bandas de absorção características das fases  $\alpha$  e  $\beta$  do PVDF. Adaptado de (72).

	$\alpha$	$\beta$
Comprimento de onda	408	510
(cm-1)	532	840
	614	1279
	763	
	795	
	855	
	976	

### 3.6 Desenvolvimento de compósitos: Processamento de filmes de P(VDF-TrFe) e P(VDF-TrFe) /AgNPs

Recorrendo novamente à técnica de *Doctor blade* foram desenvolvidos filmes de P(VDF-TrFE) e filmes de P(VDF-TrFe) contendo nanopartículas de prata (P(VDF-TrFe) /AgNPs). O processo efetuado na síntese destes filmes foi similar ao descrito na seção 3.4 para os filmes de PVDF e PVDF/AgNPs.

Para a obtenção de filmes não porosos, o substrato de vidro foi colocado na estufa (*P-Selecta*) a 210 °C durante 10 minutos, permitindo a rápida evaporação do solvente tal como mencionado em 3.4. Contudo, foram também produzidos filmes de P(VDF-TrFe) porosos onde a evaporação do solvente ocorreu à temperatura ambiente durante um período de 3 dias (Figura 3.3).

Os filmes de P(VDF-TrFE) /AgNPs produzidos apresentam uma concentração de AgNPs igual a 1.69 % (p/p). Para a produção destes filmes, as AgNPs, foram ressuspensas em DMF e colocadas em banho de ultrassons (*FB15056, Fisherbrand*) durante aproximadamente 1 hora, permitindo a dispersão das nanopartículas.



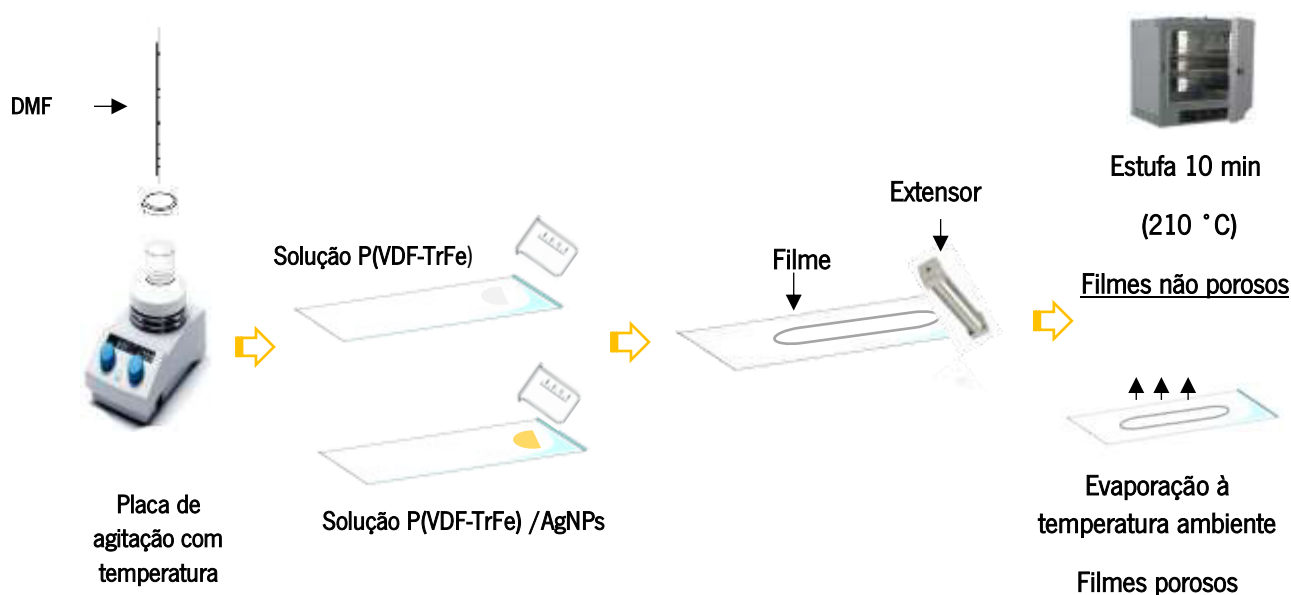


Figura 3.3 Método de processamento de filmes porosos e não porosos por *Doctor Blade*.

## 3.7 Caracterização dos compósitos de P(VDF-TrFE) e P(VDF-TrFE) / AgNPs

### 3.7.1 Microscopia eletrônica de varrimento

A morfologia dos filmes foi visualizada por microscopia eletrônica de varrimento utilizando o equipamento *NOVA Nano SEM 200* FEI após o revestimento com ouro/paládio com uma espessura de aproximadamente 10 nm. O microscópio foi operado a 10 kV e as amostras analisadas a uma distância de trabalho de 8 mm e 10 000X de ampliação.

### 3.7.2 Propriedades térmicas

#### 3.7.2.1 Calorimetria diferencial de varrimento

A calorimetria diferencial de varrimento (DCS do inglês *Differential Scanning Calorimetry*) é uma das técnicas mais utilizadas para estudar a resposta dos polímeros no que diz respeito a alterações de temperatura. O método de funcionamento baseia-se no registo de fluxo calorífico, que se associa às diferentes transições de fase, em relação a uma câmara de referência vazia. O sistema de funcionamento tem como função medir a quantidade de calor absorvido (processo

endotérmico) ou irradiado (processo exotérmico) em comparação à referência quando ambas são submetidas ao mesmo sistema de aquecimento e de arrefecimento. Através desta técnica é possível determinar diferentes fases do polímero como a fase de transição vítrea ( $T_g$ ), a temperatura de cristalização ( $T_c$ ) e a temperatura de fusão ( $T_m$ ) (89, 90).

O grau de cristalinidade ( $\Delta X_c$ ) do material é outra das informações que podemos obter recorrendo a esta técnica e que é calculado a partir da equação 3.4:

$$\Delta x_c = \frac{\Delta H_f}{\Delta H_{100}} \quad \text{Equação 3.4}$$

onde  $\Delta H$  é a entalpia de fusão da amostra em estudo e  $\Delta H_{100}$  a entalpia de fusão de uma amostra 100 % cristalina (103,4 J/g) (91) .

O estudo de calorimetria diferencial de varrimento foi conduzido no equipamento *Perkin Elmer DSC-6000* (Figura 3.4), sob atmosfera de nitrogénio para estudar o efeito da presença de AgNPs na temperatura de fusão e avaliar a quantidade de fração cristalina presente na matriz polimérica. A temperatura do equipamento foi calibrada com os padrões de índio e zinco. Para a calibração do fluxo de calor, apenas a amostra padrão de índio foi utilizada.

As amostras foram cortadas em pequenos pedaços da região uniforme dos filmes e colocadas em cápsulas de alumínio de 50  $\mu$ L. As cápsulas foram aquecidas dos 30 °C aos 350 °C com uma taxa de aquecimento constante igual a 10 °C.min<sup>-1</sup>.



**Figura 3.4.** Equipamento utilizado nos ensaios de calorimetria diferencial de varrimento: *Perkin Elmer DSC-6000*.

### 3.7.2.2 Análise termogravimétrica

A análise termogravimétrica (TGA do inglês *Thermogravimetry Analysis*) é uma técnica destrutiva de análise calorimétrica que estuda a variação da massa de uma amostra em função da temperatura. Estas variações podem estar relacionadas com fatores como a degradação do material, processos de oxidação ou desidratação.

Numa análise termogravimétrica podem ser feitos dois tipos de ensaios distintos: ensaios dinâmicos e isotérmicos. Os ensaios dinâmicos são realizados quando a substância é submetida a um gradiente de temperatura segundo uma determinada velocidade de aquecimento. Por outro lado, os ensaios isotérmicos são utilizados quando a substância é submetida a uma temperatura constante durante um determinado intervalo de tempo.

Esta técnica requer equipamento como uma termobalança composta por uma microbalança de alta sensibilidade e um forno com um programador de temperatura e atmosfera controlada. Outro dos constituintes fundamentais é o gás de purga, geralmente inerte, não só para evitar reações com a amostra, mas também para melhor a condução do calor. É necessário também um sistema de controlo, recolha e tratamento de dados (92, 93).

Um termograma exprime a variação de massa das amostras em função do tempo ou temperatura. Pontos de decréscimo e estabilização da massa indicam o intervalo de temperatura de degradação e o declive da curva a rapidez com que o material se degrada (94).

A avaliação da perda de peso foi realizada com recurso ao equipamento *Perkin Elmer TGA-4000* (Figura 3.5). Os testes ocorreram entre os 30 °C e 600 °C, com uma taxa de aquecimento de 20 °C.min<sup>-1</sup>. Todos os ensaios foram realizados usando cápsulas de alumínio de 30 µL e as amostras para este estudo foram cortadas dos filmes originais em pequenos pedaços iguais.



**Figura 3.5.** Equipamento utilizado nos ensaios de análise termogravimétrica: *Perkin Elmer TGA-4000*.

### 3.7.3 Espetroscopia de infravermelho com transformadas de Fourier

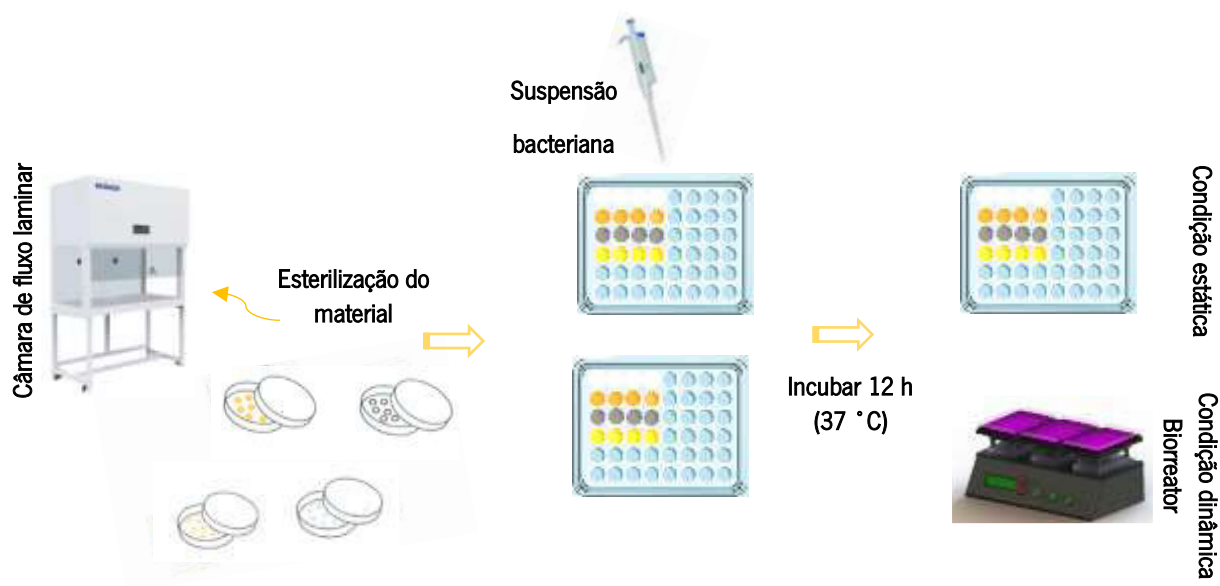
Recorreu-se à técnica de espectroscopia de infravermelho com transformadas de Fourier para identificar as fases cristalinas presentes nos filmes compósitos de P(VDF-TrFe) e P(VDF-TrFe)/AgNPs. O P(VDF-TrFe) apresenta configuração tipo *all trans* (TTT') planar, identificada pela banda de absorção características da fase  $\beta$  do PVDF aos 840 cm<sup>-1</sup>. De forma a confirmar a inexistência da fase  $\alpha$  é também importante referir que a sua banda característica de absorção se encontra presente aos 763 cm<sup>-1</sup> tal como apresentado anteriormente na tabela 3.2.

Os espectros foram obtidos com recurso ao espectrofotómetro *Spectrum Two™* da *Perkin-Elmer*, que possui um sistema de reflexão total atenuada (ATR do inglês *Attenuated Total Reflection*). Os parâmetros utilizados nas condições de análise foram os mesmo previamente mencionados na seção 3.5.1.

### 3.8 Ensaios antimicrobianos: Compósitos de P(VDF-TrFE) e P(VDF-TrFE) / AgNPs em condições estáticas e dinâmicas

Os ensaios antimicrobianos foram realizados em todos os filmes desenvolvidos (filmes porosos e não porosos de P(VDF-TrFE) e filmes porosos e não poroso de P(VDF-TrFE) / AgNPs). Primeiramente, antes de se iniciar qualquer teste os materiais desenvolvidos foram previamente cortados em círculos de 13 mm de diâmetro. De seguida, foram esterilizados por exposição à luz ultravioleta durante 30 minutos (cada face do material) e colocados posteriormente em placas de poliestireno de 24 poços.

Para a preparação do pré-inóculo bacteriano, incubou-se uma colónia da cultura *stock* da bactéria correspondente (*E. coli* e *S. epidermidis*) a 37 °C *overnight* e 110 rpm. A densidade ótica (DO) de cada cultura bacteriana inoculada foi medida a 600 nm e ajustada para  $0,05 \pm 0,01$  em ambos os casos (3). Da suspensão bacteriana obtida para cada cultura, aproximadamente 250 µL foram então colocados em contacto com o material nas respetivas placas de poliestireno de 24 poços. Para cada condição (estática e dinâmica) foram utilizados poços sem qualquer material como controlo para o crescimento bacteriano. Para avaliar o crescimento bacteriano aderido ao material (*Live/Dead kit*) ou em suspensão (crescimento planctónico), foram criadas duas condições de crescimento diferente. Em condições estáticas, as bactérias foram colocadas a crescer durante 12 horas a 37 ° C, sem agitação ou qualquer outro estímulo. Por outro lado, em condições dinâmicas, a placa de 24 poços foi colocada num biorreator fabricado em laboratório, com estimulação mecânica por um período de 12 horas (Figura 3.6 e Figura 3.7). Estes estímulos correspondem a um módulo de vibração vertical com uma frequência de 4 Hz e amplitude igual a 1 mm.



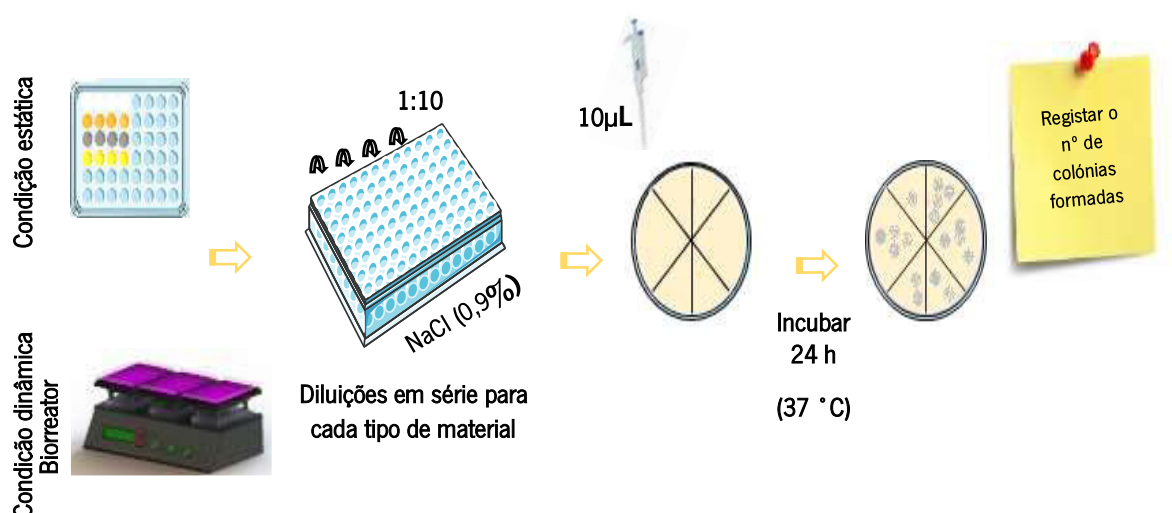
**Figura 3.6.** Representação esquemática dos procedimentos efetuados para os ensaios antimicrobianos de *E. coli* e *S. epidermidis* em condições estáticas e dinâmicas: esterilização e incubação do material.



**Figura 3.7.** Biorreator mecânico fabricado em laboratório utilizado nos ensaios antimicrobianos em condições dinâmicas.

### 3.8.1 Avaliação da viabilidade das células planctônicas em solução: CFU

A viabilidade das células bacterianas em suspensão sujeitas a condições estáticas e dinâmicas foi avaliada pelo ensaio de CFU. O sobrenadante bacteriano foi removido de cada poço realizando-se uma diluição em série de dez vezes numa solução salina estéril de cloreto de sódio (NaCl 0,9 %). Para cada diluição, foi plaqueado um volume de 10  $\mu\text{L}$  em placas de agar contendo meio NB (*Nutrient Broth*) e posteriormente incubadas a 37 °C durante 24 horas. Após esse período foi determinado o número de bactérias viáveis, permitindo uma avaliação quantitativa da média de unidades formadoras de colônia por mililitro de solução de pré-inóculo ( $\text{CFU mL}^{-1}$ ) (Figura 3.8). Todo o processo foi repetido três vezes para cada condição em estudo.



**Figura 3.8.** Representação esquemática dos procedimentos efetuados para os ensaios de viabilidade planctônica.

### 3.8.2 Avaliação de bactérias aderidas: Ensaios de *LIVE/DEAD*

A microscopia de fluorescência baseia-se no princípio de que um certo material emite energia detetável quando irradiado com luz a um comprimento de onda específico (95). O microscópio de fluorescência é constituído fundamentalmente pela parte mecânica, que comporta o sistema de suporte e o sistema de focagem e, pela parte ótica, que comporta o sistema de ampliação e o sistema de iluminação (Figura 3.9).

Na microscopia de fluorescência a energia é absorvida essencialmente pelo átomo excitado. O elétron, após absorver energia, transita para um nível energético superior e, por fim depois de absorver energia o elétron regressa ao seu estado inicial emitindo um fóton. A luz originária da fonte de luz colocada num extremo do microscópio, encontra-se em frente a um filtro de excitação que apenas vai deixar passar a radiação com o comprimento de onda desejado, sendo este coincidente com o material fluorescente. A radiação depois passa pelo espelho dicromático fazendo com que os elétrons sejam excitados para um nível energético superior. Quando estes átomos perdem a energia de excitação, retomam ao nível energético de repouso e emitem luz (fótons). Para que a luz emitida se torne visível esta, volta a passar pelo espelho dicromático sendo depois separada da luz de excitação através de um filtro barreira. Uma vez que a luz emitida apresenta energia mais baixa e um comprimento de onda maior, isto facilita a separação da radiação e as áreas fluorescentes são então exibidas e poder-se-ão observar ao microscópio, evidenciadas contra um fundo escuro de alto contraste (96).

O desvio de Stokes corresponde à diferença entre as posições no espectro dos pontos máximos das bandas de absorção e emissão de fluorescência para a mesma transição eletrônica. Geralmente, a emissão de fluorescência ocorre a um comprimento de onda superior ao de absorção. À medida que o desvio de Stokes aumenta, torna-se mais fácil separar a luz de excitação da de emissão através da combinação dos filtros (95).

Contudo, um largo espectro de condições que regularmente surgem e afetam as radiações de fluorescência vão reduzir a sua intensidade num processo designado de desvanecimento, sendo este subdividido em fenómenos de *quenching* e *photobleaching*. O *photobleaching* corresponde à decomposição irreversível das moléculas fluorescentes no seu estado excitado devido à interação destas moléculas com o oxigénio molecular antes de emitirem energia. O processo de relaxamento após estado excitatório, no *quenching*, resulta numa redução da intensidade de fluorescência através de uma variedade de mecanismos que envolvem perda de energia não radiativa e frequentemente ocorre como resultado de agentes oxidantes ou da presença de sais. Em alguns casos, o *quenching* resulta da transmissão de energia para outra molécula (denominada aceitador) fisicamente próxima do fluoróforo excitado (o dador), sendo este fenómeno conhecido por transferência ressonante de energia por fluorescência (FRET do inglês *fluorescence resonance energy transfer*) (96, 97).

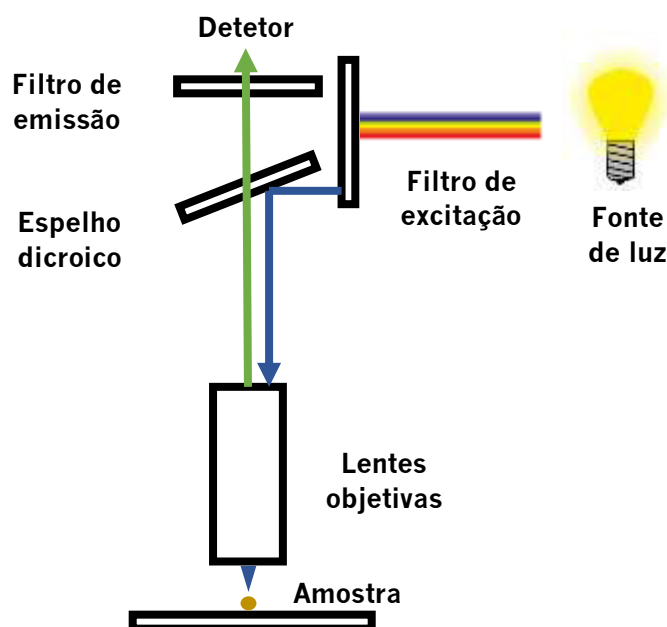


Figura 3.9. Representação esquemática do microscópio de fluorescência.



A adesão bacteriana na superfície do material, com e sem estímulo mecânico, foi avaliada utilizando o *kit* de viabilidade bacteriana *LIVE/DEAD™ BacLight™* para microscopia (*Invitrogen, US*). Para isso, as amostras foram lavadas com tampão fosfato salino (PBS do inglês *Phosphate-Buffered Saline*) e, em seguida, coradas durante 15 minutos na ausência de luz com uma mistura 1,5 µL de verde (SYTO 9) e vermelho (iodeto de propídio) fluorescente. Posteriormente, as amostras foram devidamente aplicadas em lamínas e observadas ao microscópio de fluorescência (*Olympus BX51*). Os campos representativos das amostras em estudo foram capturados usando uma ampliação de 40X.

## 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

---

## 4.1 Caracterização das nanopartículas de prata

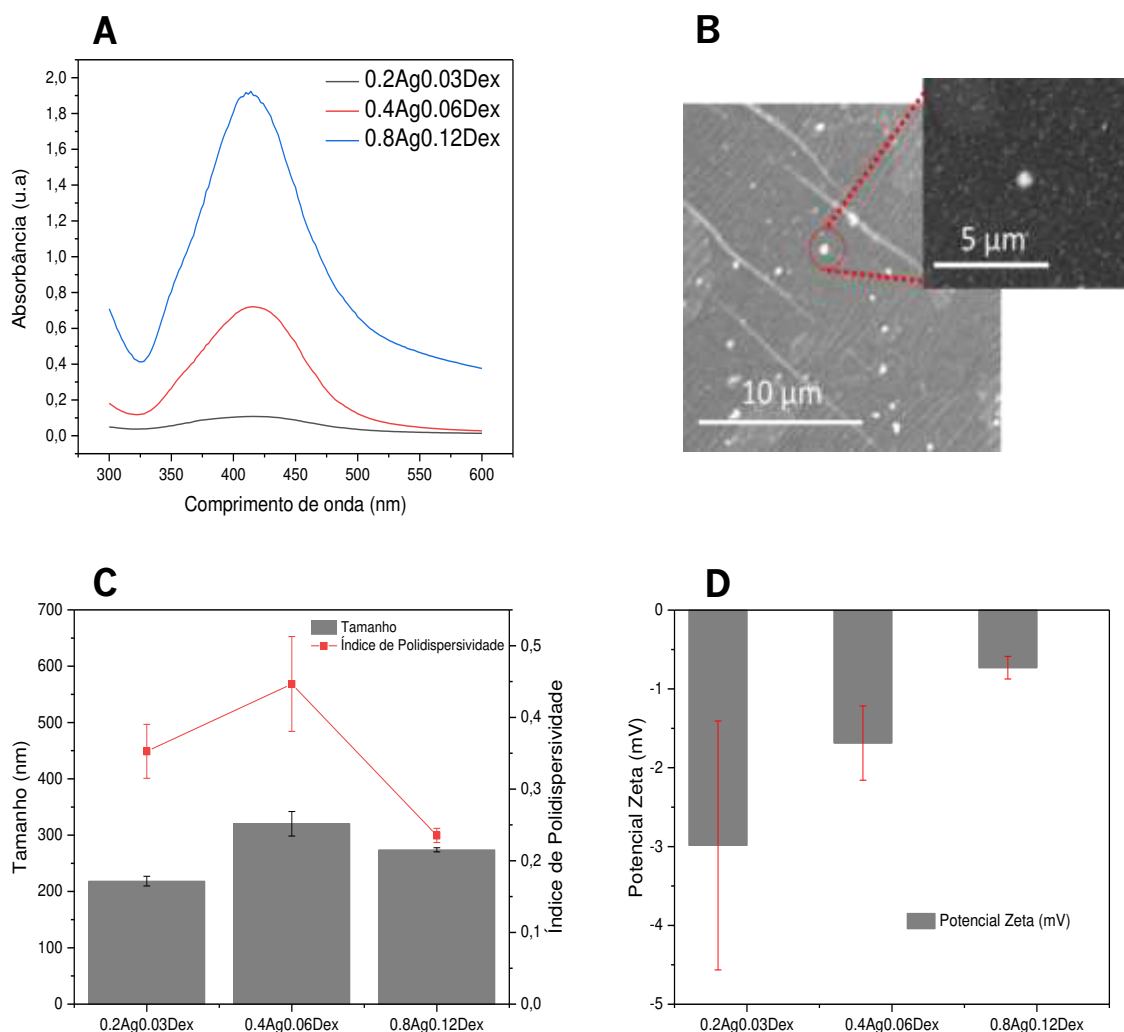
As AgNPs desenvolvidas neste estudo e sintetizadas através de um processo de síntese sustentável do ponto de vista ecológico, foram produzidas utilizando diferentes concentrações de  $\text{AgNO}_3$  e dextrano de forma a obter nanopartículas com propriedades adequadas ao desenvolvimento dos compósitos, principalmente em termos de propriedades antimicrobianas (Figura 4.1). Estas nanopartículas são ecologicamente aceitas uma vez que durante o processo de síntese não foram utilizados produtos químicos agressivos para reduzir os íons prata em prata metálica. Em vez disso foi utilizado dextrano, que também é um composto importante com capacidade de gerar nanopartículas estáveis e biocompatíveis (55).



**Figura 4.1.** Nanopartículas de prata produzidas com diferentes concentrações de  $\text{AgNO}_3$  e de dextrano: 0.2Ag0.03Dex, 0.4Ag0.06Dex e 0.8Ag0.12Dex.

Os espectros de absorção UV-vis dos colóides de prata em função da concentração de dextrano (Dex) e prata (Ag) são apresentados na Figura 4.2A. A análise espectrofotométrica da solução de AgNPs revelou que todos os espectros apresentam a mesma característica espectral com valores máximos de absorbância em torno dos 415 nm revelando características da ressonância plasmônica de superfície da prata, geralmente localizada entre 405-425 nm (98). No entanto, a intensidade do pico aumenta com o aumento das concentrações de  $\text{AgNO}_3$  e dextrano. Uma caracterização adicional das nanopartículas revelou que estas apresentam uma forma esférica com diâmetros médios de aproximadamente 270 nm (Figura 4.2B e Figura 4.2C). O índice de polidispersividade variou de 0,235 a 0,466 (Figura 4.2C), indicando que as nanopartículas obtidas são polidispersas, sendo a população de nanopartículas menos polidispersa a que apresenta maior concentração de  $\text{AgNO}_3$  e dextrano.

As partículas com potencial zeta mais positivos que + 30 mV ou mais negativo que – 30 mV são normalmente consideradas estáveis (99). Assim, neste caso, as AgNPs são menos estáveis porque o potencial zeta é próximo de zero, sendo a 0.2Ag0.03Dex a amostra mais estável podendo formar aglomerados (Figura 4.2D). Contudo, este fator não é muito crucial nesta aplicação uma vez que as nanopartículas devem ser incorporadas na matriz polimérica para formar os nanocompósitos. Estes resultados indicam que as AgNPs são carregadas negativamente.

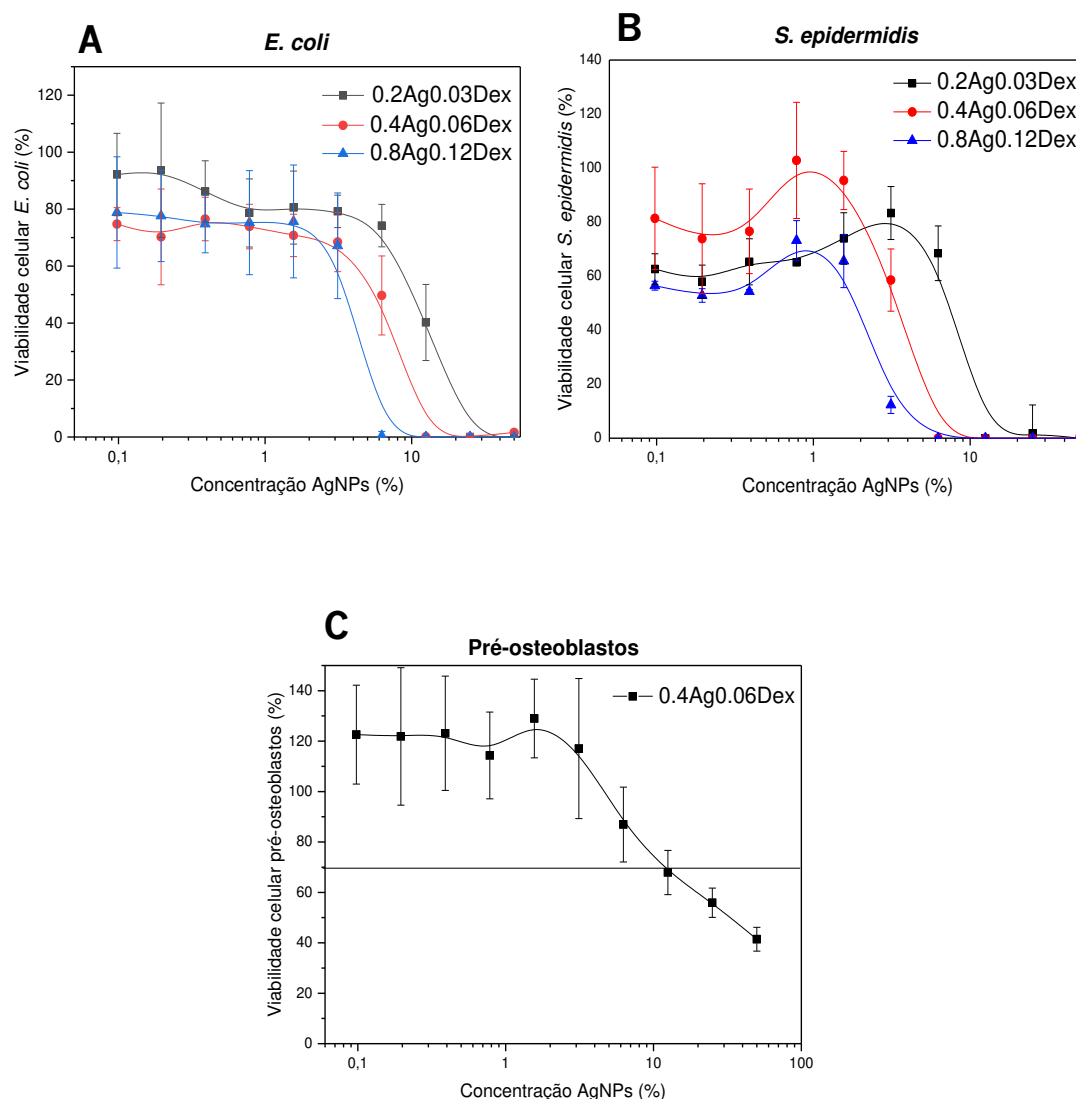


**Figura 4.2.** Caracterização das nanopartículas de prata constituídas por diferentes concentrações de Ag e Dextrano (0.2Ag0.03Dex, 0.4Ag0.06Dex e 0.8Ag0.12Dex). **(A)** Análise espectrofotométrica de absorção UV-vis das AgNPs; **(B)** Micrografia SEM representativa das AgNPs esféricas; **(C)** Análise do tamanho e do índice de polidispersividade (PDI) das AgNPs; **(D)** Análise do potencial zeta das AgNPs.

As AgNPs foram posteriormente analisadas recorrendo às suas propriedades antimicrobianas através de diluições em série das nanopartículas colocando-as em contato com as estirpes bacterianas *E. coli* (Figura 4.3A) e *S. epidermidis* (Figura 4.3B). De acordo com os resultados obtidos, podemos observar que independentemente do tipo de estirpe bacteriana, quanto maior a concentração de AgNO<sub>3</sub> e dextrano para formar as nanopartículas, menor é a concentração de AgNPs necessária para inibir o crescimento, indicando uma atividade bacteriostática mais eficaz no uso das nanopartículas 0.8Ag0.12Dex.

Por outro lado, verifica-se que *S. epidermidis* é mais suscetível na presença de AgNPs do que *E. coli* uma vez que o mecanismo de ação das AgNPs pode envolver interações com as camadas de peptidoglicanos, o que explica a maior sensibilidade das bactérias Gram-positivas em relação às AgNPs. Enquanto que as bactérias Gram-positivas apresentam uma parede celular espessa (20-80 nm) com uma camada de peptidoglicano exposta ao ambiente externo, as bactérias Gram-negativas possuem uma parede celular relativamente fina (< 10 nm) que, por sua vez, é envolvida por outra membrana externa protetora (3). Além disso, sugere-se que o comportamento antimicrobiano da prata possa ser alcançado pela libertação de Ag<sup>+</sup>, interação de bactérias com AgNPs e formação de espécies reativas de oxigénio (ROS) (46). As nanopartículas de prata acumuladas na superfície da membrana bacteriana, penetram nas bactérias e alteram a permeabilidade da membrana bacteriana, causando danos substanciais à membrana (50). Estes mecanismos de ação além de induzir danos celulares em bactérias também podem induzir danos nas células de mamíferos. Por isso foi importante determinar também a biocompatibilidade das partículas.

Embora as nanopartículas 0.8Ag0.12Dex apresentem melhores resultados a nível antimicrobiano as nanopartículas 0.4Ag0.06Dex também mostraram resultados apreciáveis e, além disso como apresentam tamanhos maiores são ideais para incorporar nos compósitos a desenvolver para a realização deste trabalho. Deste modo, foi importante avaliar a concentração a partir da qual estas nanopartículas são tóxicas e definir a janela de concentração segura para a aplicação destas nanopartículas. Os ensaios de citotoxicidade foram realizados em células de pré-osteoblastos onde é possível verificar que as AgNPs 0.4Ag0.06Dex desenvolvidas neste estudo podem ser aplicadas com segurança em concentrações abaixo de 10 % (v/v) (Figura 4.3C), dado que a viabilidade celular é mantida acima de 70 % após 24 h de contato com as nanopartículas, indicando que não ocorrem danos celulares nas células de mamíferos a estas concentrações.

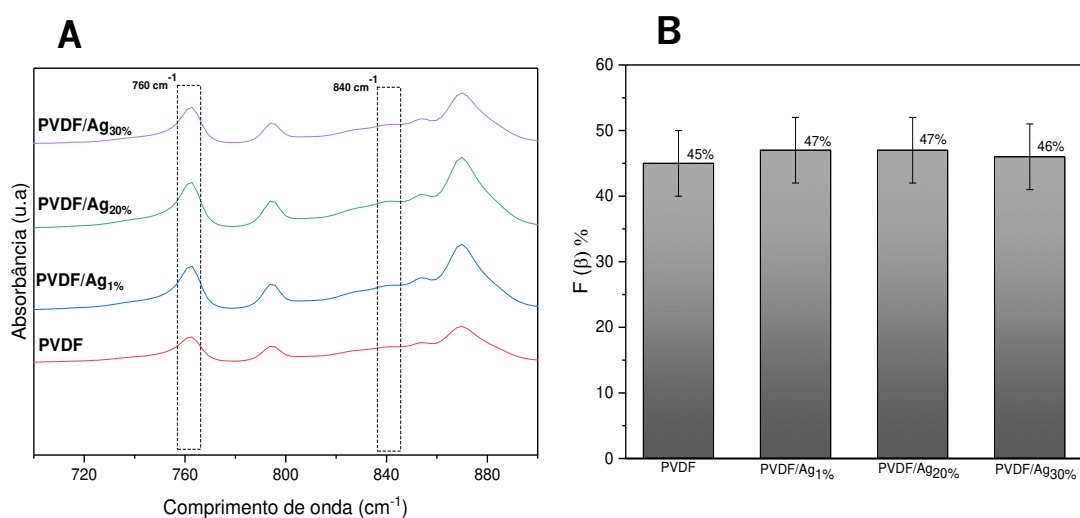


**Figura 4.3.** Ensaios antimicrobianos para avaliar a atividade bacteriostática de bactéria: **(A)** *E. coli*, **(B)** *S. epidermidis* e **(C)** ensaio de biocompatibilidade das AgNPs (0.4Ag0.06Dex) em células de pré-osteoblastos de mamíferos.

## 4.2 Análise dos compósitos desenvolvidos de PVDF e PVDF /AgNPs por Espetroscopia de Infravermelho com Transformadas de Fourier

Como referido anteriormente as nanopartículas 0.4Ag0.06Dex foram escolhidas para serem incorporadas na matriz polimérica para desenvolver os nanocompósitos. Os nanocompósitos não porosos de PVDF e PVDF /AgNPs com diferentes concentrações de AgNPs (1 %, 20 % e 30 % (p/p)) foram avaliados por FTIR de forma a investigar a nucleação da fase  $\beta$  do

PVDF pela incorporação de AgNPs. Analisando os espectros obtidos por esta técnica de caracterização podemos obter informações bastantes importantes sobre a estrutura do material permitindo fazer a distinção entre as diferentes formas cristalinas do polímero, sendo que a mais importante é a fase  $\beta$ , que é eletricamente ativa. Observando a Figura 4.4A verificamos a presença de bandas características da fase  $\alpha$  e da fase  $\beta$  do PVDF nos comprimentos de onda igual a 760 e 840  $\text{cm}^{-1}$  respetivamente, sendo que a banda  $\alpha$  a 760  $\text{cm}^{-1}$  é proeminente relativamente à  $\beta$ , indicando que o polímero cristalizou maioritariamente na fase  $\alpha$ , com e sem a presença das partículas.



**Figura 4.4.** Espectroscopia de Infravermelho com Transformadas de Fourier. **(A)** Espectro FTIR-ATR dos nanocompósitos não porosos de PVDF e PVDF contendo nanopartículas de prata e **(B)** Percentagem de F( $\beta$ ) calculada para cada nanocompósito.

No entanto, para confirmar estes resultados determinou-se a quantidade de fase  $\beta$  presente nos compósitos desenvolvidos recorrendo à equação 3.3 descrita nos materiais e métodos. Na Figura 4.4B encontra-se a percentagem de fase  $\beta$  calculada para cada nanocompósito na presença de diferentes concentrações de AgNPs assim como para o PVDF puro (controlo).

De acordo com estes resultados verificamos que, de facto, não há efeito de nucleação da fase  $\beta$  uma vez que as amostras encontram-se maioritariamente na fase  $\alpha$ , a mais comum do PVDF. Deste modo, a presença das AgNPs não induziu um efeito de nucleação da fase  $\beta$  do polímero o que não desencadearia o desejado efeito mecanoelétrico nos materiais compósitos.

Por isso, estes materiais não foram considerados adequados para o objetivo deste trabalho que é o estudo da sinergia entre os ambientes elétricos e o agente antimicrobiano usado.

### 4.3 Análise dos compósitos desenvolvidos de P(VDF-TrFe) e P(VDF-TrFe) /AgNPs

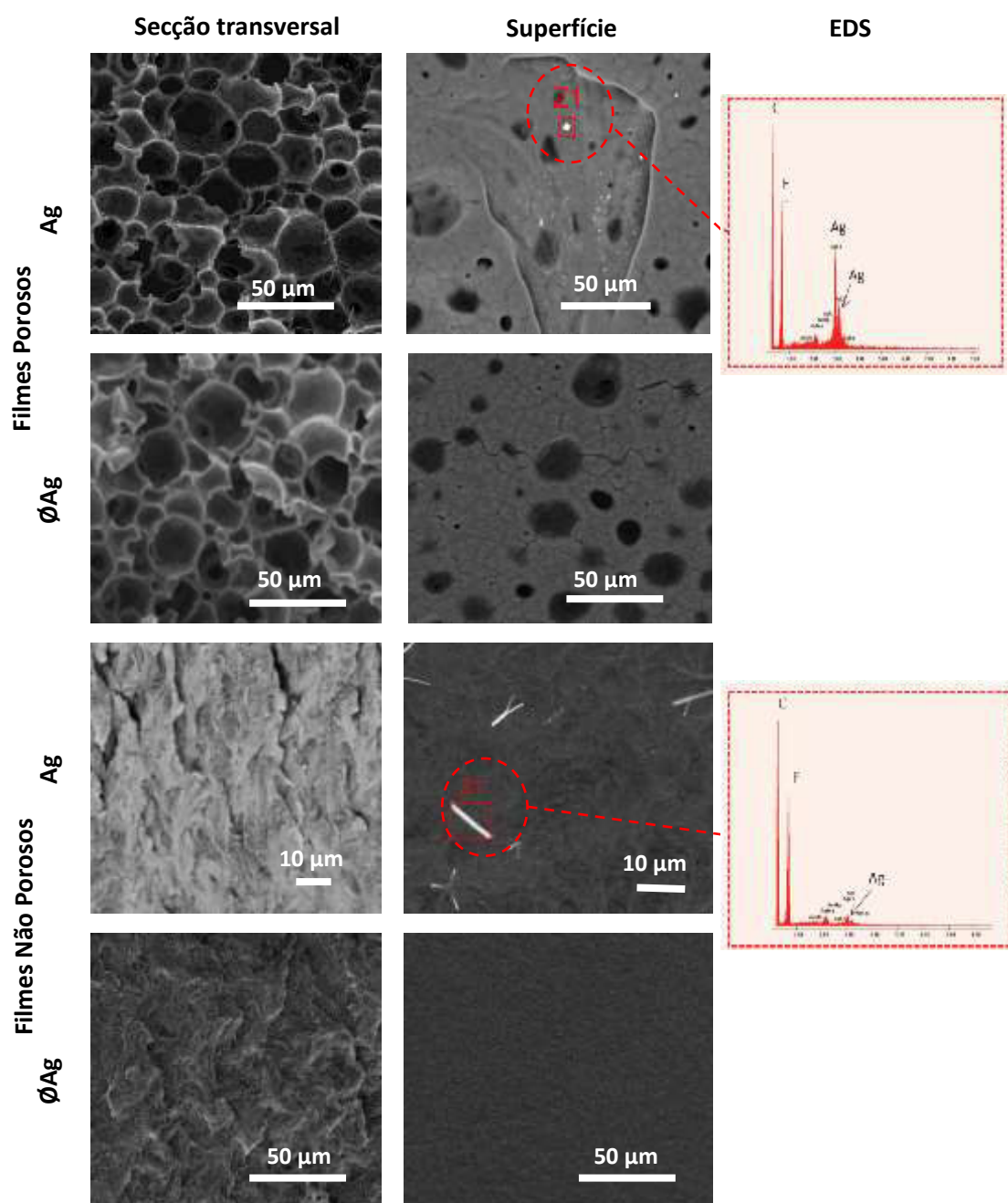
#### 4.3.1 Microscopia eletrônica de varrimento

Uma vez que os resultados obtidos utilizando os compósitos de PVDF e PVDF /AgNPs não foram os esperados, procedeu-se ao desenvolvimento de compósitos de P(VDF-TrFe) e P(VDF-TrFe) /AgNPs, para assim garantir que os materiais desenvolvidos são eletricamente ativos. O P(VDF-TrFe) cristaliza sempre na fase cristalina  $\beta$  uma vez que o monómero TrFe possui um átomo extra de flúor que induz um grande impedimento estérico na estrutura polimérica que favorece a conformação *all trans* que auxilia na formação da fase  $\beta$  do P(VDF-TrFe) (72). Estes compósitos foram de igual modo desenvolvidos utilizando as nanopartículas 0.4Ag0.06Dex.

Foram desenvolvidas duas morfologias diferentes (filmes porosos e não porosos) para estudar a influência dos poros na atividade antimicrobiana do material. Embora as superfícies lisas possam inibir a adesão de bactérias nas superfícies, o material poroso poderá promover uma melhor interação com as AgNPs que possam estar presentes no interior do material. A condição para obter este tipo de morfologia depende da temperatura à qual ocorre a cristalização do polímero. Se o polímero cristaliza a 210 °C, obtemos uma morfologia não porosa. Se o polímero cristaliza a 25 °C, o solvente evapora lentamente, induzindo a formação de poros (85). A formação dessas morfologias na presença (Ag) e ausência (ØAg) de AgNPs é mostrada na Figura 4.5. Os filmes porosos são notórios quando os filmes são preparados a 25 °C e, os poros encontram-se principalmente no interior do material, onde a interconexão dos poros parece ser observada. A inclusão das AgNPs não influencia a estrutura do material, que parecem estar presentes principalmente na superfície do material. Os pontos brancos observados nos filmes porosos são de facto as AgNPs, na qual a sua presença é provada pelo aparecimento de picos de prata através da técnica de espectroscopia de raio-X de energia dispersa (EDS do inglês *Energy Dispersive X-ray Spectroscopy*). Quando cristalizados a 210 °C, os filmes contendo AgNPs parecem formar



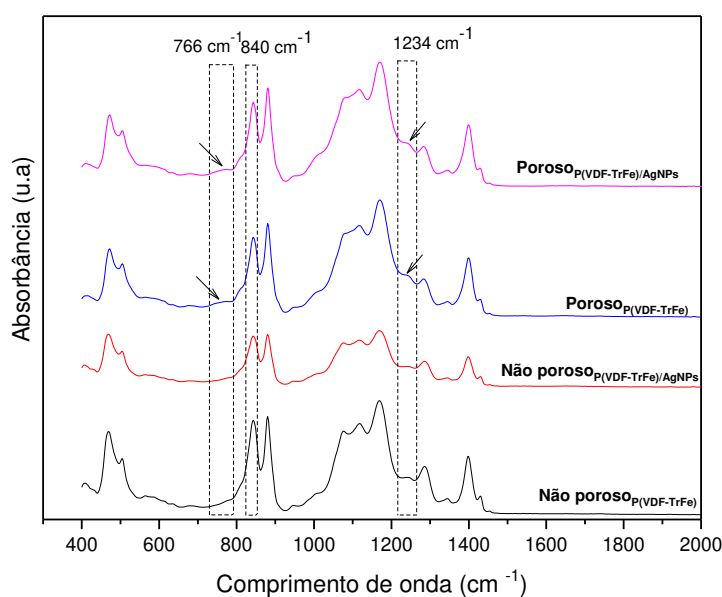
aglomerados onde se observa fios à sua superfície, que por EDS indica a presença de prata na sua constituição (Figura 4.5).



**Figura 4.5.** Imagens de microscopia eletrônica de varrimento (SEM) representativa da secção transversal e da imagem de superfície dos filmes porosos (25 °C) e não porosos (210 °C) de P(VDF-TrFe) e P(VDF-TrFe) na presença (Ag) e ausência (ØAg) de nanopartículas de prata. A imagem de superfície na presença de AgNPs é acompanhada da imagem de espectroscopia de raio-X de energia dispersa (EDS) que prova a presença de prata

### 4.3.2 Espetroscopia de Infravermelho com Transformadas de Fourier

Os espectros FTIR-ATR dos nanocompósitos porosos e não porosos de P(VDF-TrFe)/AgNPs são apresentados na Figura 4.6, onde se constata que os espectros permaneceram praticamente inalterados quando comparados aos filmes de P(VDF-TrFe) sem prata, no qual os picos observados são atribuídos principalmente ao polímero. Além disso, é possível verificar a existência da banda típica correspondente à fase  $\beta$  a  $840\text{ cm}^{-1}$ , esperada neste polímero, e que está presente em todas as amostras. De facto, ao contrário do que ocorre no PVDF, o P(VDF-TrFe) cristaliza sempre na fase ferroelétrica  $\beta$ . No entanto, podem ser observadas pequenas alterações entre filmes porosos e não porosos. Enquanto que os filmes não porosos revelam apenas a banda típica da fase  $\beta$  a  $840\text{ cm}^{-1}$ , uma pequena banda a  $766\text{ cm}^{-1}$ , típica da fase  $\alpha$  do PVDF e outra a  $1234\text{ cm}^{-1}$ , normalmente presente na fase  $\gamma$  do PVDF encontra-se presente nos filmes porosos. Embora deva ser mais investigado, parece que a estrutura porosa induz de alguma forma a formação da estrutura cristalina nas fases  $\alpha$  e  $\gamma$  no P(VDF-TrFe).



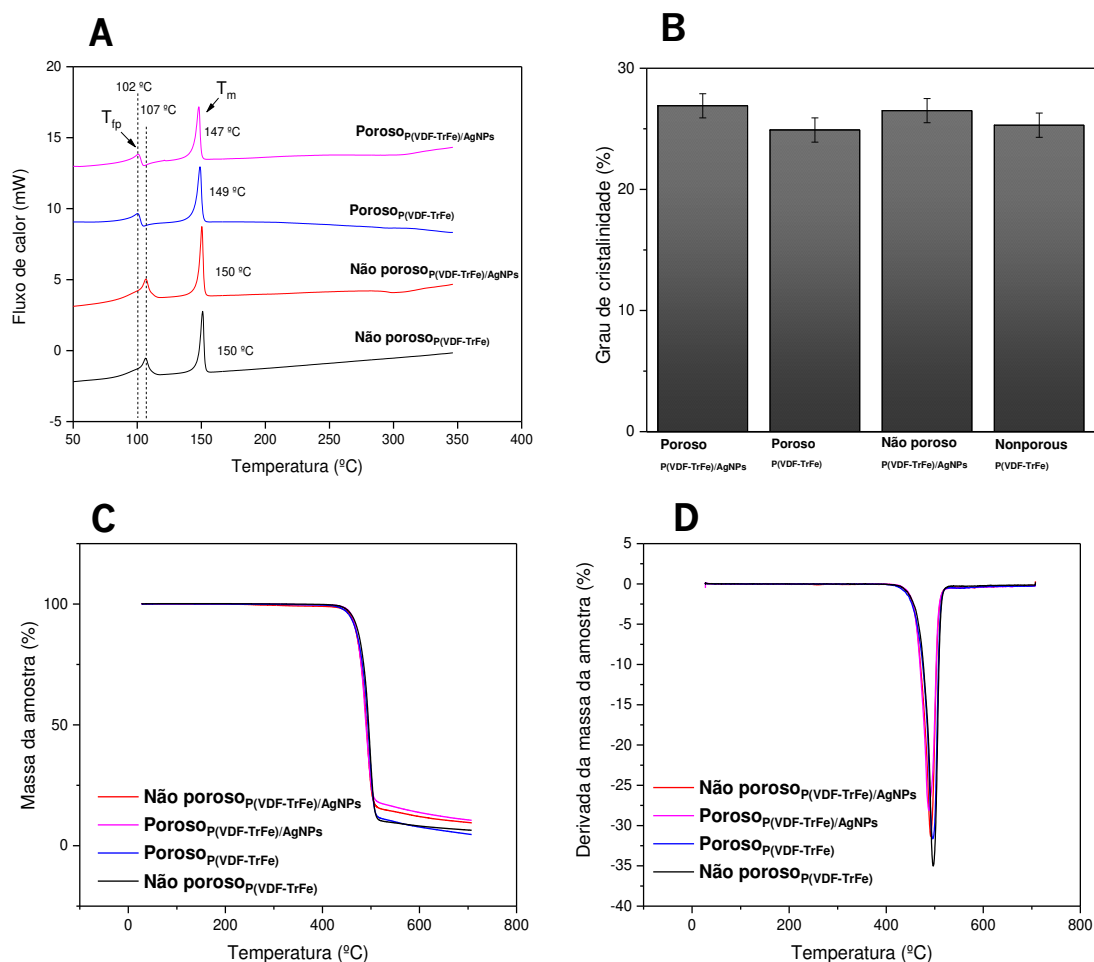
**Figura 4.6.** Espectro de FTIR-ATR dos compósitos porosos e não porosos de P(VDF-TrFe) e P(VDF-TrFe)/AgNPs.

### 4.3.3 Propriedades térmicas: Avaliação Termogravimétrica e Calorimetria Diferencial de Varrimento

A avaliação das propriedades térmicas dos compósitos é um fator muito importante para determinar o desempenho do material desenvolvido e para avaliar a cristalinidade do material. A Figura 4.7A mostra os termogramas DSC dos compósitos desenvolvidos onde dois picos endotérmicos são identificados em todas as amostras. O primeiro pico corresponde à transição de fase ferroelétrica-paraelétrica, identificada por  $T_{fp}$ , e o segundo pico representa a temperatura de fusão ( $T_f$ ) (91). Como podemos observar, os termogramas são muito semelhantes entre todos os filmes, sendo as principais diferenças encontradas entre as amostras porosas e não porosas, tal como anteriormente apresentado nos espectros de FTIR (Figura 4.6). A inclusão de AgNPs não alterou a forma das curvas DSC. O pequeno pico  $T_{fp}$  dos filmes porosos está presente a 102 °C, enquanto que o pico  $T_{fp}$  dos filmes não porosos aparece posteriormente a 107 °C. Este pico está associado ao relaxamento  $\beta$  da fase amorfa do polímero pelo que é diretamente influenciado pela morfologia dos filmes (91).

Adicionalmente foi determinado o grau de cristalinidade de cada amostra aplicando a equação 3.4. De acordo com os resultados obtidos foi possível concluir que a inclusão de AgNPs aumenta o grau de cristalinidade do polímero, induzido pelo confinamento espacial da estrutura interna do polímero.

A Figura 4.7C mostra as curvas TGA para todas as amostras e a Figura 4.7D a derivada termogravimétrica (DTG). Todas as amostras apresentam curvas termogravimétricas semelhantes e observa-se que todos os filmes são caracterizados por uma acentuada perda de peso em torno dos 400 °C devido ao principal processo de degradação do polímero. O processo ocorre em apenas um estágio, conforme indicado pelo único pico no gráfico da derivada da curva TGA (Figura 4.7D) e que continua lentamente à medida que a temperatura aumenta até 700 °C. A presença de AgNPs não influencia significativamente o processo de degradação do polímero, embora induza uma percentagem menor de perda de peso quando as nanopartículas se encontram presentes nos filmes.



**Figura 4.7.** Análise térmica dos compostos porosos e não porosos de P(VDF-TrFe) e P(VDF-TrFe)/AgNPs. **(A)** Curva DSC, **(B)** Grau de cristalinidade (%) calculado para cada nanocompósito, **(C)** Curva TGA e **(D)** Curva da derivada TGA.

## 4.4 Ensaio antimicrobianos

O efeito sinérgico entre as AgNPs e o polímero eletroativo, quando estimulado mecanicamente, foi posteriormente testado para fins antimicrobianos. Diferentes efeitos foram estudados em *E. coli* e *S. epidermidis*: morfologia, presença de prata, aplicação de estímulos piezoelétricos nos filmes que transmitem um ambiente eletroativo às células e efeito sinérgico entre os ambientes eletroativos e a prata. Estes efeitos foram estudados tanto a nível das células planctônicas em solução, que fica sobre o material, como a nível das células aderida na superfície do material.

#### 4.4.1 Estudo da capacidade antimicrobiana nas células planctônicas: atividade bacteriostática

A atividade bacteriostática foi avaliada através da capacidade dos materiais para inibir o crescimento das bactérias, usando um método de determinação da densidade ótica a 600 nm depois da incubação *overnight* e transformada em viabilidade celular através da equação 3.1.

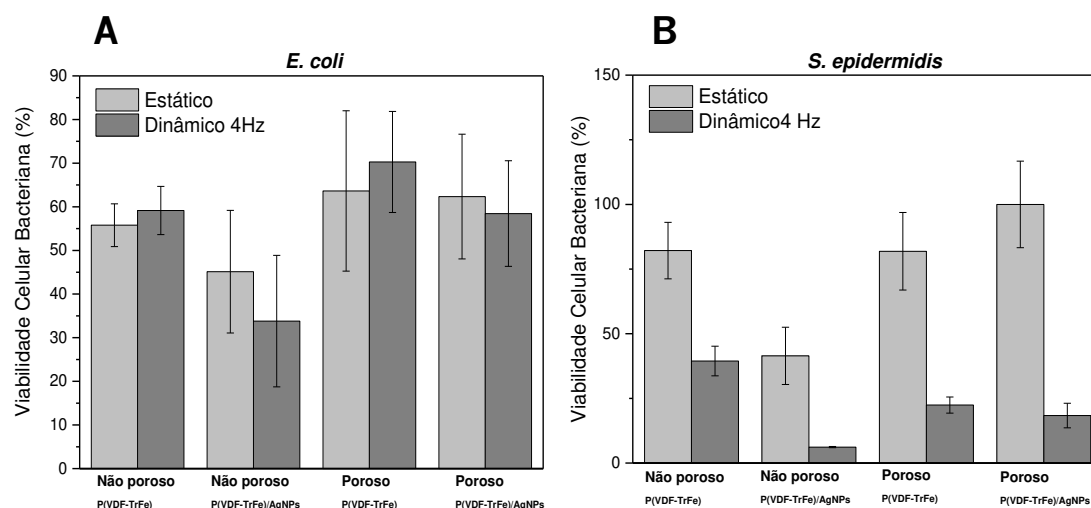
A nível morfológico, a viabilidade celular é maior nos filmes porosos, tanto nas bactérias Gram-positivas como nas Gram-negativas, indicando que as bactérias preferem superfícies porosas para despoletar o seu crescimento. Todavia, seria de esperar que o material poroso promovesse uma interação com as AgNPs presentes no interior do material de forma a inibir o crescimento bacteriano. Contudo, este efeito não é verificado na *E. coli* assim como na *S. epidermidis*, indicando claramente que, para fins antimicrobianos, os filmes não porosos são muito mais adequados (Figura 4.8A e Figura 4.8B).

A presença de AgNPs nos filmes induziu um efeito bacteriostático sobre ambas as bactérias (Figura 4.8). Contudo, foi observada uma ligeira diminuição na viabilidade celular das bactérias quando estas cresceram sobre o material não poroso que continha prata, tal como esperado, devido ao conhecido efeito bactericida da prata.

Além disso, é importante ressaltar que nos materiais foi observada outra tendência comparando a condição dinâmica e estática. A condição dinâmica foi garantida pela presença de um estímulo mecânico no material através de um bioreator, que pela sua natureza piezoelétrica gera estímulos elétricos à sua superfície e consequentemente nas células bacterianas. Após incubação *overnight* com e sem aplicação de estímulo mecânico nos filmes piezoelétricos, as bactérias de *E. coli* foram pouco influenciadas pelo estímulo aplicado, dado não existirem diferenças significativas entre as amostras com ou sem a presença de estímulo (Figura 4.8A). Aliás, quando o estímulo mecânico é aplicado, observa-se um ligeiro efeito de proliferação, indicando um possível efeito de mecanotransdução mediada pela piezoelectricidade dos materiais conforme indicado na literatura (3). Estes resultados podem sugerir que o estímulo auxilia favoravelmente o processo de proliferação através da despolarização da membrana induzindo um aumento do fluxo de iões cálcio, resultando por isso em maiores taxas de proliferação (7). De acordo com a literatura, o estímulo mecanoelétrico induz proliferação de uma maneira semelhante às células de mamíferos (64).

No caso da bactéria *S. epidermidis*, observa-se um claro efeito antimicrobiano na presença de estímulo (Figura 4.8B). Quando a bactéria Gram-positiva é exposta a um efeito piezoelétrico com frequência de 4 Hz, o crescimento da bactéria é inibido. As bactérias Gram-positivas parecem ser mais sensíveis à aplicação do estímulo, fator este que pode estar associado à composição da membrana celular a nível estrutural. Essas diferenças na membrana celular conferem propriedades diferentes às células, produzindo diferentes respostas a estímulos externos, como no caso do estímulo piezoelétrico aplicado neste estudo (100). O efeito de inibição do crescimento celular verificado para a *S. epidermidis* pode dever-se à polarização elétrica induzida no material pelo estímulo mecânico que interage com a camada de peptidoglicanos presente nas bactérias Gram-positivas, induzindo uma maior rutura na membrana celular pela inativação de enzimas necessárias à divisão bacteriana (3).

Além disso, um efeito sinérgico entre o microambiente eletroativo criado pelo estímulo mecânico e as AgNPs é observado na *S. epidermidis*. Uma diminuição acentuada da viabilidade celular das bactérias é visível quando esse crescimento ocorre sobre os filmes contendo prata e quando submetidos ao estímulo mecânico. Este evento é responsável pela inibição do crescimento celular que sugere que o efeito antimicrobiano está presente neste ensaio.



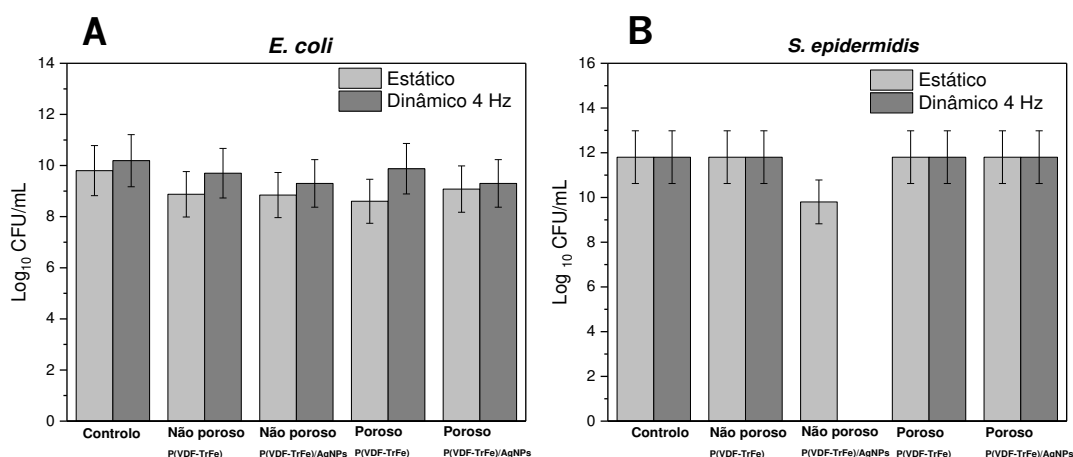
**Figura 4.8.** Atividade celular bacteriostática de (A) *E. coli* e (B) *S. epidermidis* em solução após incubação durante a noite sobre o material em condições estáticas e dinâmicas através da aplicação do estímulo mecânico no material piezoelétrico usando uma frequência de vibração mecânica de 4 Hz. A percentagem de viabilidade celular bacteriana calculada está relacionada com células controle que cresceram nas mesmas condições, mas sem o material ou estímulo. Os resultados são a média de três ensaios independentes.

#### 4.4.2 Estudo da capacidade antimicrobiana nas células planctónicas: atividade bactericida

Para determinar o efeito bactericida dos materiais, o estudo da colónia CFUs em solução depois de as sujeitar a uma incubação *overnight* foi efetuado. De acordo com os resultados apresentados na Figura 4.9A e Figura 4.9B é possível verificar que a viabilidade celular de células planctónicas não é significativamente influenciada pela morfologia dos nanocompósitos assim como pela presença de prata.

Contudo, a viabilidade celular de células planctónicas de *E. coli* é maior da presença do estímulo mecânico, tal como tinha sido observado para o efeito bacterioestático (Figura 4.8). Por outro lado, na Figura 4.9B constatámos que não existem diferenças significativas na viabilidade celular de células planctónicas de *S. epidermidis*, para a maioria das amostras, na presença e ausência de estímulo. Estas diferenças não significativas indicam que o efeito do material na maioria dos materiais não envolve morte das células bacterianas, mas sim inibição do seu crescimento, tal como acontece com o material não poroso contendo AgNPs.

Neste caso, é claramente notório um efeito sinérgico entre as AgNPs e o estímulo aplicado. Isto indica que o material na presença de estímulo mecânico assim como de AgNPs tem maior potencial antimicrobiano e que se torna ainda mais evidente nos filmes não porosos (onde não se registou crescimento bacteriano) o que corrobora com os resultados apresentados na Figura 4.8.



**Figura 4.9.** Viabilidade celular bacteriana de células planctónicas de (A) *E. coli* e (B) *S. epidermidis* em solução após incubação durante a noite sobre o material em condições estáticas e dinâmicas através da aplicação do estímulo mecânico no material piezoelétrico usando uma frequência de vibração mecânica de 4 Hz. A viabilidade celular bacteriana foi determinada em relação às células controlo que cresceram nas mesmas condições, mas sem o material ou estímulo.

#### 4.4.3 Estudo da capacidade antifouling/antibiofilme

A capacidade antibiofilme dos materiais foi determinada através da avaliação da adesão bacteriana ao material usando microscopia de fluorescência. Na Figura 4.10 e 4.11, são apresentadas as imagens fluorescentes *live/dead*, onde as células a verdes representam as células consideradas viáveis, enquanto que as células vermelhas apresentam a membrana celular comprometida e, portanto, são consideradas mortas. Os efeitos observados na superfície do material estão de acordo com o efeito observado nas bactérias em solução.

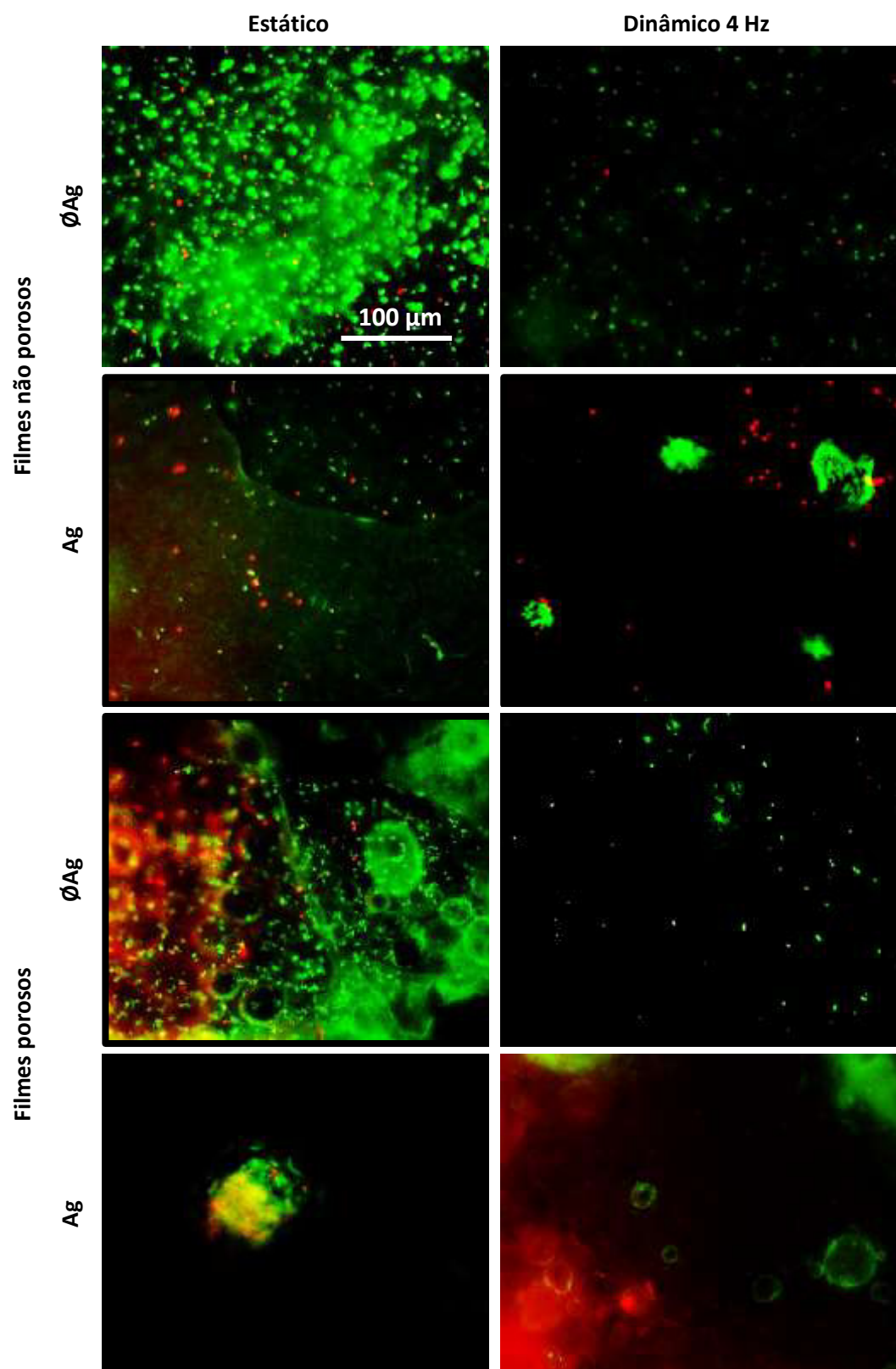
Tanto em *E. coli* como em *S. epidermidis* não se verificam grandes diferenças nas células aderidas relativamente aos filmes poros e não porosos. Contudo, os filmes porosos promovem mais facilmente a formação de biofilme sugerindo que os nutrientes necessários ao crescimento bacteriano acumulam-se no interior dos poros.

Na *E. coli* (Figura 4.10), é possível verificar que na presença de AgNPs existe um número considerável de células com membrana celular comprometida. Contudo, não existem grandes diferenças no número de células viáveis de *E. coli* na presença e ausência de estímulo.

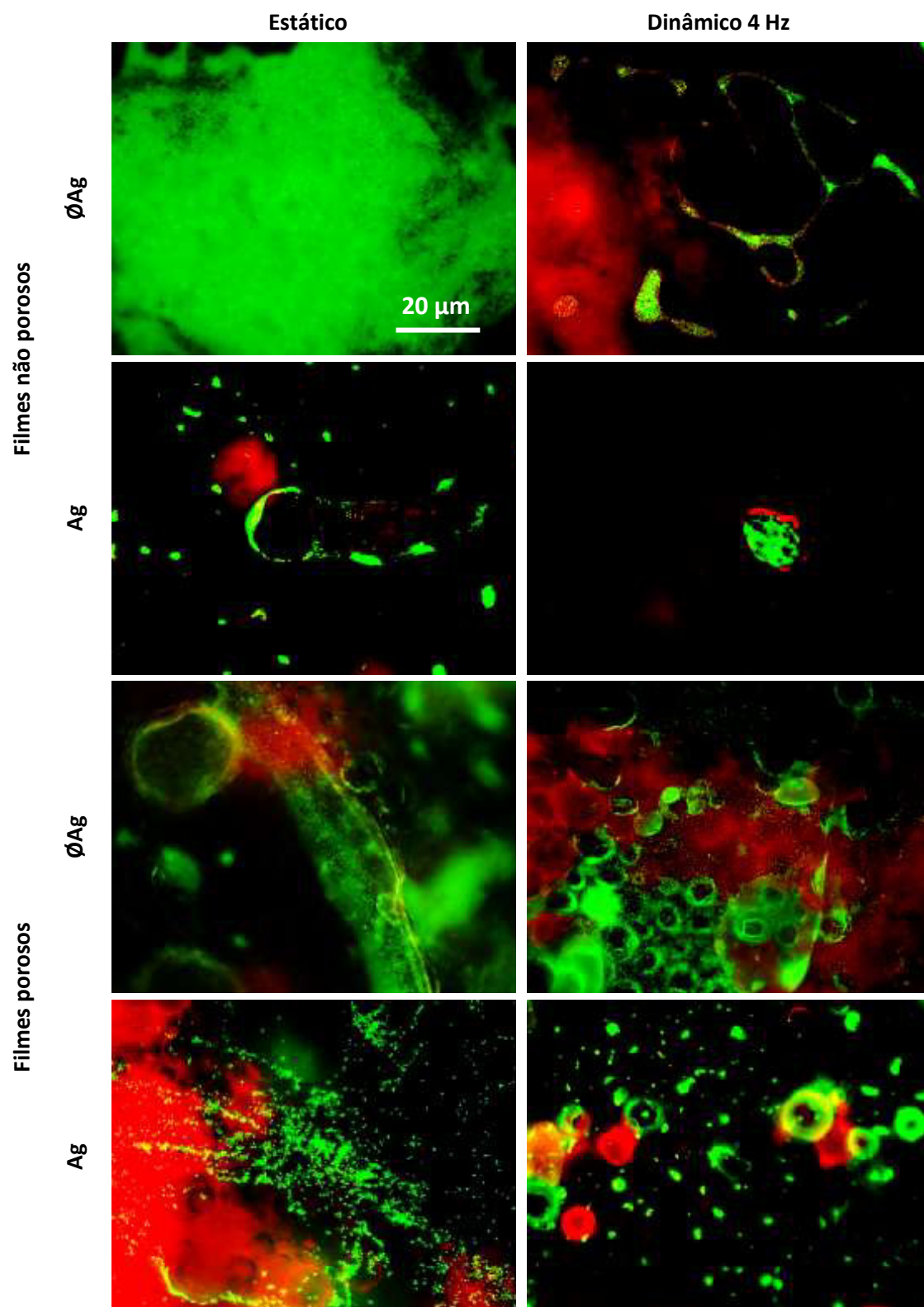
Na *S. epidermidis*, o efeito das AgNPs é também constatado dada a presença de biofilme ser menor quando comparado às imagens sem a presença de nanopartículas e onde mais células comprometidas são observadas a vermelho. No que diz respeito à presença e ausência de estímulo, em condições estáticas, a bactéria *S. epidermidis* (Figura 4.11) adere à superfície do material e forma biofilme. Quando os nutrientes da solução se depositam na superfície ou quando há um ambiente pobre em nutrientes, a adesão de bactérias em superfícies horizontais é um mecanismo de defesa usado pelas bactérias (35). A presença do estímulo induz uma diminuição no crescimento bacteriano, porque pode induzir uma solução pobre em nutrientes que fornece propriedades “*antifouling*” na superfície do material. Em condições estáticas, pode não ser suficiente a deposição dos nutrientes na solução, ou que estes sejam rapidamente consumidos em solução, promovendo um ambiente adequado ao crescimento bacteriano e por isso não sejam verificadas propriedades “*antifouling*” à superfície do material quando comparado com a aplicação do estímulo.

Tanto na bactéria Gram-negativa como Gram-positiva, verifica-se que nos materiais sujeitos ao estímulo na presença de prata ocorre um maior efeito “*antifouling*” e bactericida evidenciado pelo maior número de células bacterianas comprometidas a vermelho.





**Figura 4.10.** Imagens *Live/Dead* de *E. coli* por microscopia de fluorescência em diferentes superfícies do material após 12h de incubação. A barra de escala representa 100  $\mu\text{m}$  para todas as imagens.



**Figura 4.11.** Imagens *Live/Dead* de *S. epidermidis* por microscopia de fluorescência em diferentes superfícies do material após 12h de incubação. A barra de escala representa 20 µm para todas as imagens.

Como forma de uniformizar e sintetizar os resultados obtidos neste trabalho, resumiu-se, na Tabela 4.1 os efeitos estudados e observados com os materiais compósitos aqui desenvolvidos.

**Tabela 4.1.** Resumo das principais conclusões obtidas neste trabalho.

Efeitos estudados	Efeitos observados			
	<i>E. coli</i>		<i>S. epidermidis</i>	
	Planctônicas	Aderidas	Planctônicas	Aderidas
<b>Morfologia</b>	Inibição de crescimento bacteriano é maior em filmes não porosos	Não se verificam diferenças à superfície	Inibição de crescimento bacteriano é maior em filmes não porosos	Não se verificam diferenças à superfície
<b>AgNPs</b>	Inibição de crescimento bacteriano é maior quando os materiais apresentam prata	Aumento das células comprometidas (mortas) nos materiais com AgNPs	Inibição de crescimento bacteriano é maior quando os materiais apresentam prata	Maior n° de células comprometidas (mortas) nos materiais com AgNPs
<b>Estímulo mecanoelétrico</b>	Não apresenta diferenças significativas com exceção do filme não poroso com prata	Efeito antifouling/antibiofilme	O efeito mecanoelétrico inibe o crescimento bacteriano em todos os materiais	Efeito <i>antifouling</i> /antibiofilme
<b>Sinergia</b> (Estímulo mecanoelétrico+ AgNPs)	Não apresenta diferenças significativas com exceção do filme não poroso com prata	Efeito antifouling/antibiofilme e maior n° de células comprometidas à superfície:  <b>SINERGIA</b>	A inibição é maior na presença de efeito mecanoelétrico e AgNPs simultaneamente, induzindo valor abaixo dos 5 % de viabilidade celular:  <b>SINERGIA</b>	Efeito antifouling/antibiofilme e maior n° de células comprometidas à superfície:  <b>SINERGIA</b>

## 5. CONCLUSÃO

---

No presente trabalho foram produzidos materiais compósitos em forma de filmes porosos e não porosos composto por um polímero piezoelétrico e por AgNPs, previamente sintetizadas de uma forma considerada amiga do ambiente pois usa o dextrano como agente redutor da prata. Com os materiais foi possível criar microambientes elétricos através da aplicação de um estímulo mecânico utilizando um bioreator, capaz de induzir uma resposta elétrica no material que posteriormente é traduzido para as células bacterianas.

As AgNPs sintetizadas usando dextrano como agente redutor, foram cuidadosamente caracterizadas e, em termos de tamanho, demonstraram ter cerca de 270 nm de diâmetro, potencial zeta apresentando carga negativa, capacidade antimicrobiana, inibindo o crescimento bacteriano a concentrações acima dos 7-10 % (v/V) e biocompatibilidade a concentrações abaixo dos 10 % (v/V).

Os materiais foram posteriormente desenvolvidos, e numa primeira fase foi testado PVDF e a capacidade das AgNPs sintetizadas nuclearem a fase  $\beta$  do PVDF, a fase importante para garantir que o material seja eletricamente ativo. Verificou-se, no entanto, que as partículas não cumpriram o propósito, pois mesmo utilizando uma quantidade elevada de AgNPs (30 % (p/p)) a fase  $\beta$  calculada foi similar à do filme PVDF sem as AgNPs.

Para ser possível estudar a sinergia entre ambientes elétricos e o agente antimicrobiano (prata) na capacidade antimicrobiana dos materiais foi então necessário desenvolver os mesmos com o polímero P(VDF-TrFe), pois seja qual for as condições à qual o material é desenvolvido este cristaliza sempre na fase eletroativa  $\beta$ .

Os nanocompósitos de P(VDF-TrFe) incorporados com AgNPs foram então também caracterizados em termos de morfologia, propriedades físico químicas, propriedades térmicas e capacidade antimicrobiana. Através da caracterização morfológica destes nanocompósitos foi possível concluir que os filmes porosos apresentam poros à sua superfície e no interior enquanto que os não porosos apresentam uma morfologia lisa. Além disso, confirmou-se que o polímero cristalizou na fase  $\beta$  eletroativa, tal como esperado, e que este fator não foi influenciado pela presença de AgNPs. A nível das propriedades térmicas, conclui-se que as AgNPs aumentam ligeiramente o grau de cristalinidade do polímero e que os materiais são termicamente estáveis. Por fim, os estudos antimicrobianos, mostraram que a *E. coli* é menos sensível à aplicação do estímulo quando comparada à *S. epidermidis*. A presença de AgNPs nos filmes mostrou induzir a inibição do crescimento bacteriano em células planctónicas e aderidas, tanto em condições

estáticas como em condições dinâmicas. As propriedades biocidas e “*antifouling*” foram observadas na presença de estímulo piezoelétrico dinâmico, indicando um efeito sinérgico eficiente entre as propriedades biocidas das AgNPs e os microambientes eletroativos.

Os resultados obtidos na realização deste trabalho demonstram a potencialidade dos materiais eletroativos em sinergia com as AgNPs como agente antimicrobiano que podem agora ser vistos como um importante avanço no combate à resistência antimicrobiana. Estes materiais podem, por exemplo, ser utilizados na prevenção de infecções bacterianas nomeadamente em áreas médicas através do revestimento de superfícies. Um exemplo da aplicabilidade destes nanocompósitos poderá ser em próteses ósseas, onde o estímulo piezoelétrico está presente dado que o osso também apresenta propriedades eletroativas e onde a ocorrência de infecções bacterianas depois da aplicação da prótese é frequente.

### 5.1 Sugestões para trabalhos futuros

Todos os objetivos delineados nesta dissertação de mestrado foram cumpridos, sendo simultaneamente proposta uma nova estratégia com aplicabilidade em estudos de combate à resistência antimicrobiana.

Deste modo, sugerem-se os seguintes trabalhos futuros:

- Realização de ensaios antimicrobianos similares utilizando outras estirpes de bactérias Gram-positivas e Gram-negativas como modelo;
- Estudar o efeito da polarização dos filmes na capacidade antimicrobiana;
- Testar estes materiais no revestimento de superfícies médicas, por exemplo, em dispositivos médicos ou cateteres urinários;
- Estudar o possível efeito combinado da proliferação celular de osteoblastos (o osso tem resposta piezoelétrica) com o efeito bactericida nos filmes com o estímulo mecânico, o que ajudaria ao desenvolvimento de uma nova geração de próteses ósseas.

## 6. BIBLIOGRAFIA

---

1. Lanceros-Mendez S, Macedo M, Carvalho E. Electroactive smart materials: novel tools for tailoring bacteria behavior and fight antimicrobial resistance. *Frontiers in bioengineering and biotechnology*. 2019;7:277.
2. Lopes AC, Carabineiro SA, Pereira MF, Botelho G, Lanceros-Mendez S. Nanoparticle size and concentration dependence of the electroactive phase content and electrical and optical properties of Ag/poly(vinylidene fluoride) composites. *Chemphyschem*. 2013;14(9):1926-33.
3. Carvalho EO, Fernandes MM, Padrao J, Nicolau A, Marques-Marchan J, Asenjo A, et al. Tailoring Bacteria Response by Piezoelectric Stimulation. *ACS Appl Mater Interfaces*. 2019;11(30):27297-305.
4. Fernandes MM, Correia DM, Ribeiro C, Castro N, Correia V, Lanceros-Mendez S. Bioinspired Three-Dimensional Magnetoactive Scaffolds for Bone Tissue Engineering. *ACS Applied Materials & Interfaces*. 2019;11(48):45265-75.
5. Perez RA, Won J-E, Knowles JC, Kim H-W. Naturally and synthetic smart composite biomaterials for tissue regeneration. *Advanced drug delivery reviews*. 2013;65(4):471-96.
6. Biais N, Higashi DL, Brujić J, So M, Sheetz MP. Force-dependent polymorphism in type IV pili reveals hidden epitopes. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2010;107(25):11358-63.
7. Bruni GN, Weekley RA, Dodd BJ, Kralj JM. Voltage-gated calcium flux mediates *Escherichia coli* mechanosensation. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2017;114(35):9445-50.
8. Rasmussen B. Filamentous microfossils in a 3,235-million-year-old volcanogenic massive sulphide deposit. *Nature*. 2000;405(6787):676-9.
9. Miller EL. The penicillins: a review and update. *J Midwifery Womens Health*. 2002;47(6):426-34.
10. Gould IM, Bal AM. New antibiotic agents in the pipeline and how they can help overcome microbial resistance. *Virulence*. 2013;4(2):185-91.
11. Laxminarayan R, Amábile-Cuevas CF, Cars O, Evans T, Heymann DL, Hoffman S, et al. UN High-Level Meeting on antimicrobials—what do we need? *The Lancet*. 2016;388(10041):218-20.



12. Uchil RR, Kohli GS, Katekhaye VM, Swami OC. Strategies to combat antimicrobial resistance. *J Clin Diagn Res.* 2014;8(7):ME01-4.
13. O'Neill J. AMR Review Paper-Tackling a crisis for the health and wealth of nations. *AMR Review Paper*,(December). 2014.
14. Relman DA. Microbiology: learning about who we are. *Nature.* 2012;486(7402):194.
15. Jørgensen PS, Wernli D, Carroll SP, Dunn RR, Harbarth S, Levin SA, et al. Use antimicrobials wisely. *Nature News.* 2016;537(7619):159.
16. Kim KO, Gluck M. Fecal microbiota transplantation: an update on clinical practice. *Clinical endoscopy.* 2019;52(2):137.
17. Fayaz AM, Balaji K, Girilal M, Yadav R, Kalaichelvan PT, Venketesan R. Biogenic synthesis of silver nanoparticles and their synergistic effect with antibiotics: a study against gram-positive and gram-negative bacteria. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine.* 2010;6(1):103-9.
18. Ribeiro C, Correia V, Martins P, Gama FM, Lanceros-Mendez S. Proving the suitability of magnetoelectric stimuli for tissue engineering applications. *Colloids Surf B Biointerfaces.* 2016;140:430-6.
19. Paces WR, Holmes HR, Vlaisavljevich E, Snyder KL, Tan EL, Rajachar RM, et al. Application of sub-micrometer vibrations to mitigate bacterial adhesion. *Journal of functional biomaterials.* 2014;5(1):15-26.
20. Asadi MR, Torkaman G. Bacterial Inhibition by Electrical Stimulation. *Adv Wound Care (New Rochelle).* 2014;3(2):91-7.
21. Valič B, Pavlin M, Miklavčič D. The effect of resting transmembrane voltage on cell electroporation: a numerical analysis. *Bioelectrochemistry.* 2004;63(1-2):311-5.
22. Boda SK, Basu B. Engineered biomaterial and biophysical stimulation as combinatorial strategies to address prosthetic infection by pathogenic bacteria. *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials.* 2017;105(7):2174-90.
23. Ueshima M, Tanaka S, Nakamura S, Yamashita K. Manipulation of bacterial adhesion and proliferation by surface charges of electrically polarized hydroxyapatite. *Journal of Biomedical Materials Research: An Official Journal of The Society for Biomaterials, The Japanese Society for Biomaterials, and The Australian Society for Biomaterials and the Korean Society for Biomaterials.* 2002;60(4):578-84.

24. Ghodbane S, Lahbib A, Sakly M, Abdelmelek H. Bioeffects of static magnetic fields: oxidative stress, genotoxic effects, and cancer studies. *BioMed research international*. 2013;2013.
25. Li SH, Chow K-C. Magnetic field exposure induces DNA degradation. *Biochemical and Biophysical research communications*. 2001;280(5):1385-8.
26. Ivanova K, Fernandes MM, Mendoza E, Tzanov T. Enzyme multilayer coatings inhibit *Pseudomonas aeruginosa* biofilm formation on urinary catheters. *Applied microbiology and biotechnology*. 2015;99(10):4373-85.
27. Ivanova K, Fernandes MM, Francesko A, Mendoza E, Guezguez J, Burnet M, et al. Quorum-quenching and matrix-degrading enzymes in multilayer coatings synergistically prevent bacterial biofilm formation on urinary catheters. *ACS applied materials & interfaces*. 2015;7(49):27066-77.
28. Ivanova K, Fernandes M, Tzanov T. Current advances on bacterial pathogenesis inhibition and treatment strategies. *Microbial pathogens and strategies for combating them: science, technology and education*. 2013;4.
29. Murray R, Steed P, Elson H. The location of the mucopeptide in sections of the cell wall of *Escherichia coli* and other gram-negative bacteria. *Canadian journal of microbiology*. 1965;11(3):547-60.
30. Shockman GD, Barren JF. Structure, function, and assembly of cell walls of gram-positive bacteria. *Annual review of microbiology*. 1983;37(1):501-27.
31. Wilhelm MJ, Sheffield JB, Sharifian Gh M, Wu Y, Spahr C, Gonella G, et al. Gram's Stain Does Not Cross the Bacterial Cytoplasmic Membrane. *ACS Chem Biol*. 2015;10(7):1711-7.
32. Heukelekian H, Heller A. Relation between food concentration and surface for bacterial growth. *Journal of bacteriology*. 1940;40(4):547.
33. Poindexter JS. The caulobacters: ubiquitous unusual bacteria. *Microbiological reviews*. 1981;45(1):123.
34. Davies D. Understanding biofilm resistance to antibacterial agents. *Nat Rev Drug Discov*. 2003;2(2):114-22.
35. Tuson HH, Weibel DB. Bacteria-surface interactions. *Soft Matter*. 2013;9(18):4368-80.
36. Belas R. Biofilms, flagella, and mechanosensing of surfaces by bacteria. *Trends Microbiol*. 2014;22(9):517-27.

37. Song F, Koo H, Ren D. Effects of Material Properties on Bacterial Adhesion and Biofilm Formation. *Journal of Dental Research*. 2015;94(8):1027-34.
38. Romling U, Balsalobre C. Biofilm infections, their resilience to therapy and innovative treatment strategies. *J Intern Med*. 2012;272(6):541-61.
39. Fulaz S, Vitale S, Quinn L, Casey E. Nanoparticle-Biofilm Interactions: The Role of the EPS Matrix. *Trends Microbiol*. 2019;27(11):915-26.
40. O'Toole G, Kaplan HB, Kolter R. Biofilm formation as microbial development. *Annual Reviews in Microbiology*. 2000;54(1):49-79.
41. Khatoon Z, McTiernan CD, Suuronen EJ, Mah TF, Alarcon EI. Bacterial biofilm formation on implantable devices and approaches to its treatment and prevention. *Heliyon*. 2018;4(12):e01067.
42. Satpathy S, Sen SK, Pattanaik S, Raut S. Review on bacterial biofilm: An universal cause of contamination. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*. 2016;7:56-66.
43. Oubekka SD, Briandet R, Fontaine-Aupart M-P, Steenkest K. Correlative time-resolved fluorescence microscopy to assess antibiotic diffusion-reaction in biofilms. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2012;56(6):3349-58.
44. He Q, Yuan T, Zhu J, Luo Z, Haldolaarachchige N, Sun L, et al. Magnetic high density polyethylene nanocomposites reinforced with in-situ synthesized Fe@FeO core-shell nanoparticles. *Polymer*. 2012;53(16):3642-52.
45. Ge M, Cao C, Huang J, Li S, Chen Z, Zhang K-Q, et al. A review of one-dimensional TiO<sub>2</sub> nanostructured materials for environmental and energy applications. *Journal of Materials Chemistry A*. 2016;4(18):6772-801.
46. Rebelo R, Calderon S, Figueiro R, Henriques M, Carvalho S. Influence of oxygen content on the antibacterial effect of Ag-O coatings deposited by magnetron sputtering. *Surface and Coatings Technology*. 2016;305:1-10.
47. Lee HY, Park HK, Lee YM, Kim K, Park SB. A practical procedure for producing silver nanocoated fabric and its antibacterial evaluation for biomedical applications. *Chemical Communications*. 2007(28):2959-61.
48. Rai M, Yadav A, Gade A. Silver nanoparticles as a new generation of antimicrobials. *Biotechnology Advances*. 2009;27(1):76-83.
49. Wong KK, Liu X. Silver nanoparticles—the real “silver bullet” in clinical medicine? *MedChemComm*. 2010;1(2):125-31.

50. Zheng K, Setyawati MI, Leong DT, Xie J. Antimicrobial silver nanomaterials. *Coordination Chemistry Reviews*. 2018;357:1-17.
51. Baygar T, Sarac N, Ugur A, Karaca IR. Antimicrobial characteristics and biocompatibility of the surgical sutures coated with biosynthesized silver nanoparticles. *Bioorg Chem*. 2019;86:254-8.
52. Jalali SAH, Allafchian AR. Assessment of antibacterial properties of novel silver nanocomposite. *Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers*. 2016;59:506-13.
53. Khodashenas B, Ghorbani HR. Synthesis of silver nanoparticles with different shapes. *Arabian Journal of Chemistry*. 2019;12(8):1823-38.
54. Carré-Rangel L, Alonso-Núñez G, Espinoza-Gómez H, Flores-López LZ. Green synthesis of silver nanoparticles: effect of dextran molecular weight used as stabilizing-reducing agent. *Journal of nanoscience and nanotechnology*. 2015;15(12):9849-55.
55. Davidovic S, Lazic V, Vukoje I, Papan J, Anhrenkiel SP, Dimitrijevic S, et al. Dextran coated silver nanoparticles - Chemical sensor for selective cysteine detection. *Colloids Surf B Biointerfaces*. 2017;160:184-91.
56. Ribeiro C, Sencadas V, Correia DM, Lanceros-Méndez S. Piezoelectric polymers as biomaterials for tissue engineering applications. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. 2015;136:46-55.
57. Ribeiro CMO. Processing and characterization of piezoelectric polymers for tissue engineering applications 2012.
58. Cardoso V, Ribeiro C, Lanceros-Mendez S. Metamorphic biomaterials. *Bioinspired Materials for Medical Applications: Elsevier*; 2017. p. 69-99.
59. Zhang Z, Demir KG, Gu GX. Developments in 4D-printing: a review on current smart materials, technologies, and applications. *International Journal of Smart and Nano Materials*. 2019;10(3):205-24.
60. Barati B, Karana E, Hekkert P. Prototyping materials experience: Towards a shared understanding of underdeveloped smart material composites. *International Journal of Design*. 2019;13(2):21-38.
61. Cardoso VF, Correia DM, Ribeiro C, Fernandes MM, Lanceros-Méndez S. Fluorinated polymers as smart materials for advanced biomedical applications. *Polymers*. 2018;10(2):161.

62. Ribeiro S, Correia D, Ribeiro C, Lanceros-Méndez S. Electrospun polymeric smart materials for tissue engineering applications. *Electrospun biomaterials and related technologies*: Springer; 2017. p. 251-82.
63. Cardoso VF. Sistema de fluxo acústico de base polimérica para aplicações microfluídicas. 2012.
64. Ribeiro C, Correia DM, Ribeiro S, Sencadas V, Botelho G, Lanceros-Méndez S. Piezoelectric poly(vinylidene fluoride) microstructure and poling state in active tissue engineering. *Engineering in Life Sciences*. 2015;15(4):351-6.
65. Chen S, Wei Y, Wei S, Lin Y, Liu L. Ultrasensitive cracking-assisted strain sensors based on silver nanowires/graphene hybrid particles. *ACS applied materials & interfaces*. 2016;8(38):25563-70.
66. Ribeiro C, Moreira S, Correia V, Sencadas V, Rocha JG, Gama F, et al. Enhanced proliferation of pre-osteoblastic cells by dynamic piezoelectric stimulation. *Rsc Advances*. 2012;2(30):11504-9.
67. Chen QX, Payne PA. Industrial applications of piezoelectric polymer transducers. *Measurement Science and Technology*. 1995;6(3):249.
68. Gregorio Jr R. Determination of the  $\alpha$ ,  $\beta$ , and  $\gamma$  crystalline phases of poly (vinylidene fluoride) films prepared at different conditions. *Journal of Applied Polymer Science*. 2006;100(4):3272-9.
69. Broadhurst M, Davis G, McKinney J, Collins R. Piezoelectricity and pyroelectricity in polyvinylidene fluoride—A model. *Journal of applied physics*. 1978;49(10):4992-7.
70. Zhu Y, Li C, Na B, Lv R, Chen B, Zhu J. Polar phase formation and competition in the melt crystallization of poly (vinylidene fluoride) containing an ionic liquid. *Materials Chemistry and Physics*. 2014;144(1-2):194-8.
71. Magalhães RMS. Desenvolvimento de Poli (fluoreto de vinilideno) poroso na fase  $\beta$  para aplicações Biomédicas 2009.
72. Martins P, Lopes A, Lanceros-Mendez S. Electroactive phases of poly (vinylidene fluoride): Determination, processing and applications. *Progress in polymer science*. 2014;39(4):683-706.
73. Legrand J. Structure and ferroelectric properties of P (VDF-TrFE) copolymers. *Ferroelectrics*. 1989;91(1):303-17.

74. Nunes-Pereira J, Ribeiro S, Ribeiro C, Gombek CJ, Gama F, Gomes A, et al. Poly (vinylidene fluoride) and copolymers as porous membranes for tissue engineering applications. *Polymer Testing*. 2015;44:234-41.
75. Hoo CM, Starostin N, West P, Mecartney ML. A comparison of atomic force microscopy (AFM) and dynamic light scattering (DLS) methods to characterize nanoparticle size distributions. *Journal of Nanoparticle Research*. 2008;10(1):89-96.
76. Bhattacharjee S. DLS and zeta potential - What they are and what they are not? *J Control Release*. 2016;235:337-51.
77. Hunter RJ. *Zeta potential in colloid science: principles and applications*: Academic press; 2013.
78. Zhou W, Wang ZL. *Scanning microscopy for nanotechnology: techniques and applications*: Springer science & business media; 2007.
79. Rodrigues ARO. *Desenvolvimento de magnetolipossomas baseados em nanopartículas de níquel com coroa de sílica para aplicações na entrega de fármacos antitumorais* 2012.
80. Martins PMA. *Produção e caracterização de nanopartículas magnéticas para aplicação biotecnológica* 2011.
81. Goldstein JI, Newbury DE, Echlin P, Joy DC, Lyman CE, Lifshin E, et al. *The SEM and Its Modes of Operation. Scanning Electron Microscopy and X-ray Microanalysis*: Springer; 2003. p. 21-60.
82. Figueiredo H. *Reutilização catalítica de biosorventes suportados em zeólitos* 2007.
83. Andrews JM. Determination of minimum inhibitory concentrations. *Journal of antimicrobial Chemotherapy*. 2001;48(suppl\_1):5-16.
84. Fernandes M, Correia DM, Ribeiro C, Castro N, Correia V, Lanceros-Mendez S. Bioinspired three-dimensional magneto-active scaffolds for bone tissue engineering. *ACS applied materials & interfaces*. 2019.
85. Ribeiro C, Costa CM, Correia DM, Nunes-Pereira J, Oliveira J, Martins P, et al. Electroactive poly (vinylidene fluoride)-based structures for advanced applications. *Nature protocols*. 2018;13(4):681.
86. Lanceros-Mendez S, Mano J, Costa A, Schmidt VH. FTIR and DSC studies of mechanically deformed  $\beta$ -PVDF films. *Journal of Macromolecular Science, Part B*. 2001;40(3-4):517-27.

87. Dorling KM, Baker MJ. Highlighting attenuated total reflection Fourier transform infrared spectroscopy for rapid serum analysis. *Trends in biotechnology*. 2013;31(6):327-8.
88. Ferreira J, Monteiro T, Lopes A, Costa C, Silva MM, Machado A, et al. Variation of the physicochemical and morphological characteristics of solvent casted poly (vinylidene fluoride) along its binary phase diagram with dimethylformamide. *Journal of Non-Crystalline Solids*. 2015;412:16-23.
89. Schawe J, Bergmann E. Investigation of polymer melting by temperature modulated differential scanning calorimetry and it's description using kinetic models. *Thermochimica acta*. 1997;304:179-86.
90. Gabbott P. Principles and applications of thermal analysis: John Wiley & Sons; 2008.
91. Costa CM, Rodrigues LC, Sencadas V, Silva MM, Rocha JG, Lanceros-Méndez S. Effect of degree of porosity on the properties of poly(vinylidene fluoride–trifluorethylene) for Li-ion battery separators. *Journal of Membrane Science*. 2012;407-408:193-201.
92. Gonçalves RF. Desenvolvimento de nanocompósitos poliméricos de PVDF-Zeólitos para aplicações tecnológicas 2011.
93. Coats A, Redfern J. Thermogravimetric analysis. A review. *Analyst*. 1963;88(1053):906-24.
94. Botelho G, Lanceros-Méndez S, Gonçalves A, Sencadas V, Rocha JG. Relationship between processing conditions, defects and thermal degradation of poly (vinylidene fluoride) in the  $\beta$ -phase. *Journal of non-crystalline solids*. 2008;354(1):72-8.
95. Sanderson MJ, Smith I, Parker I, Bootman MD. Fluorescence microscopy. *Cold Spring Harbor Protocols*. 2014;2014(10):pdb. top071795.
96. Lichtman JW, Conchello J-A. Fluorescence microscopy. *Nature methods*. 2005;2(12):910-9.
97. Rost FW. Fluorescence microscopy: Cambridge University Press; 1992.
98. Bankura K, Maity D, Mollick MM, Mondal D, Bhowmick B, Bain M, et al. Synthesis, characterization and antimicrobial activity of dextran stabilized silver nanoparticles in aqueous medium. *Carbohydrate Polymers*. 2012;89(4):1159-65.
99. Clogston JD, Patri AK. Zeta potential measurement. Characterization of nanoparticles intended for drug delivery: Springer; 2011. p. 63-70.
100. Mai-Prochnow A, Clauson M, Hong J, Murphy AB. Gram positive and Gram negative bacteria differ in their sensitivity to cold plasma. *Scientific reports*. 2016;6:38610.